

**Passive Beladung lipidbasierter kolloidaler Dispersionen mit schwer wasserlöslichen  
Substanzen - Studien zur praktischen Nutzung und zu physikochemischen Aspekten**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte

**D i s s e r t a t i o n**

von Eva Kupetz  
aus Freiberg/Sachsen

1. Referentin:	Professorin Dr. Heike Bunjes
2. Referentin:	Professorin Dr. Christel Müller-Goymann
eingereicht am:	13.07.2015
mündliche Prüfung (Disputation) am:	17.12.2015

Druckjahr 2016

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Kupetz, E., Preu, L., Kunick, C. & Bunjes, H. Parenteral formulation of an antileishmanial drug candidate – Tackling poor solubility, chemical instability, and polymorphism. Eur. J. Pharm. Biopharm. 85 (3 Part A): 511–520 (2013).

Kupetz, E. & Bunjes, H. Lipid nanoparticles: Drug localization is substance-specific and achievable load depends on size and physical state of the particles. J. Contr. Rel. 189: 54-64 (2014)

### **Tagungsbeiträge**

Kupetz, E. & Bunjes, H.: Passive loading of lipid nanoparticles with poorly water soluble drugs. (Vortrag) Annual Meeting of the German Local Chapter of the Controlled Release Society, Jena (2011).

Kupetz, E. & Bunjes, H.: Passive loading of lipid nanoparticles with poorly water soluble drugs. (Poster) 25<sup>th</sup> European Colloid and Interface Society Meeting, Berlin (2011).

Kupetz, E., Ryczak, J., Kunick, C. & Bunjes, H.: Solubilization of the new antileishmanial drug KuRei300 with lipid based colloidal carrier systems using a passive loading approach. (Poster) 8<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Istanbul (2012).

Kupetz, E., Preu, L. & Bunjes, H.: Chemical stability studies on the antileishmanial drug candidate KuRei300 in lipid based nanocarrier formulations as important prerequisite for *in vivo* studies. (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Greifswald (2012).

Kupetz, E. & Bunjes, H.: Poorly soluble drugs - screening for suitable nanocarriers. (Poster) MedTech Pharma, Nürnberg (2014).

Kupetz, E. & Bunjes, H.: Effects of particle size and structure on the drug loading capacity of lipid nanoparticles. (Vortrag) 6<sup>th</sup> International Congress on Pharmaceutical Engineering, Graz (2014).

## Danksagung

In allererster Linie bedanke ich mich herzlichst bei Frau Prof. Heike Bunjes, die das Entstehen der vorliegenden Arbeit betreut hat. Vielen Dank für die Überlassung des spannenden und vielfältigen Themas, das ich unter Ihrer hervorragenden fachlichen Anleitung nach meinen eigenen Ideen mit Leben füllen konnte. Ich danke Ihnen für das mir entgegengebrachte Vertrauen, das stetige Interesse an meiner Arbeit und Ihr jederzeit offenes Ohr. Aus unseren konstruktiven Diskussionen bin ich stets inspiriert und motiviert wieder an die Arbeit gegangen. Ihre Begeisterung für die Wissenschaft hat mich in demotivierten Phasen immer wieder mitgerissen. Danke, dass Sie sich für all Ihre Doktoranden und deren Arbeit mit Herzblut engagieren.

Bei Frau Prof. Müller-Goymann bedanke ich mich sehr für die Übernahme des Koreferats.

Ich danke Herrn Prof. Conrad Kunick und Prof. Charles Jaffe für die wunderbare Möglichkeit, an einem Projekt mitzuwirken, in dem die Brücke zwischen pharmazeutischer Chemie, pharmazeutischer Technologie und *In-vivo*-Evaluation geschlagen wurde.

Ich habe sehr gern mit den Mitgliedern des Arbeitskreises von Prof. Kunick zusammengearbeitet.

Vielen Dank an Herrn Prof. Kunick für die unkomplizierte Bereitstellung der Zentrifuge. Ich bedanke mich außerdem für die freundliche Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Einen ganz besonderen Dank an Herrn Dr. Lutz Preu für die überaus wertvollen und geduldigen Gespräche über die NMR-Daten. Danke, dass ich jederzeit meine Fragen stellen durfte.

Frau Dr. Jasmin Ryczak danke ich für die Synthese des KuRei300. Ich habe außerdem unsere erfrischenden Gespräche über NMR im Besonderen und die Pharmazie und das Leben im Allgemeinen sehr genossen.

Herrn Prof. Dr. Charles Jaffe danke ich für die gute Zusammenarbeit und die persönliche Gastfreundschaft bei meinen Aufenthalten in Jerusalem.

Für helfende Hände in der Praxis danke ich vielmals Katharina Dahl, die die TEM-Aufnahmen angefertigt hat. Ebenso danke ich Friederike Mengersen und Andreas Arnold für die Herstellung von Cholesterylmyristat- beziehungsweise Trimyristinnanopartikeln am Microfluidizer.

Für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Formulierungsprojektes mit KuRei300 danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG). Ich danke außerdem allen Firmen, die mir kostenfrei Material zur Verfügung gestellt haben: BASF, Lipoid, Danisco.

Danke an die „alten Bunnies“, die mich als Hasenfrischling in die Arbeitsgruppe aufgenommen haben: Birthe Strasdat, Christina Laabs, Frederik Laabs, Friederike Mengersen und Sonja Joseph.

Vielen Dank auch an die „neuen Bunniedamen“: Sandra Gehrmann, Katrin Göke und Elin Roese. Ihr bringt frischen Wind rein.

Ich danke außerdem Jan Henrik Finke für zahlreiche fachliche Diskussionen und immer noch den ein oder anderen Softwarettipp.

Für die Hilfe bei Probenmessungen, die Zusammenarbeit im Praktikum, gelegentliches Zustecken von Süßigkeiten oder einfach ein sonniges Gemüt bedanke ich mich bei: Frau Jahn, Carmen, Manuela, Nappi, Ulrike, Dagmar und Renate.

Bei Holger Kubiak und Sven Pape bedanke ich mich für ihre Einsatzbereitschaft und Kreativität in Sachen Feinmechanik und Elektrotechnik.

Danke Christian, Daniel, Nils und Sascha. Sei es für eure unendliche Geduld in Computerangelegenheiten oder den kleinen Schwatz vor dem Feierabend.

Ein Dankeschön von ganzem Herzen spreche ich den starken Frauen und Freundinnen aus, die ich am Institut kennenlernen durfte: Lusi, Steffi, Käthe, Kathi und Elin. Ihr seid eine Wucht! Danke für die Kraft, Unterstützung und aufmunternden Worte, die ihr mir gegeben habt.

Ein extra dicker Dank geht an den Hort der Herzlichkeit, in dem ich mich sehr wohl gefühlt habe und in den ich jeden Morgen gern zur Arbeit gekommen bin.

Einen tiefempfundenen Dank sage ich meinen alten Freunden, die mich auf Durststrecken immer ermutigt und mir aus ihrem eigenen Erfahrungsschatz wertvolle Tipps gegeben haben: Heiko, HG, Franzi, David, Celine, Heike und Sören.

Danke an die tollen Frauen aus Mannem, die mir aus der Ferne Kraft gespendet haben: Claudia, Moni und Dani.

Zu guter letzt und natürlich doch an erster Stelle danke ich meiner Familie. Auch und gerade an weniger hellen Tagen habt ihr mich bedingungslos unterstützt. Und das schon mein ganzes Leben lang. Danke!

Lukas. Du bist mein Rückenwind. Ohne dich wäre die Arbeit bestimmt eher fertig geworden, aber ich bereue nichts.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Problemstellung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Allgemeiner Teil.....</b>	<b>3</b>
2.1	Strategien zur Formulierung schlecht wasserlöslicher Wirkstoffe .....	3
2.1.1	Kolloidale Trägersysteme .....	4
2.2	Lipidbasierte kolloidale Dispersionen als Wirkstoffträgersysteme .....	6
2.2.1	Lipidnanoemulsionen.....	7
2.2.1.1	Dispersionen isotroper unterkühlter Schmelzen.....	8
2.2.2	Lipidnanosuspensionen .....	9
2.2.3	Liposomen.....	10
2.2.4	Mischmizellen mit Gallensalzen und Phospholipiden .....	12
2.2.5	Unterkühlt-smektische Lipidnanopartikel .....	12
2.2.6	Kubische Lipidnanopartikel auf Basis von Monoolein .....	14
2.3	Beladung von lipidbasierten kolloidalen Partikeln mit schwer wasserlöslichen Wirkstoffen .....	15
2.3.1	Konventionelle Beladung ( <i>de-novo</i> ).....	15
2.3.2	Passive Beladung.....	15
2.4	Lokalisation von Wirkstoffen in lipidbasierten Nanoemulsionen und Nanosuspensionen .....	16
2.5	Formulierungsfindung für neue Wirkstoffkandidaten.....	17
2.5.1	Industrielle Verfahren mit hohem Durchsatz .....	17
2.5.2	Verfahren für den Labormaßstab zur Testung kolloidaler Trägersysteme .....	18
2.6	Die antileishmanielle Substanz KuRei300 .....	19
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
3.1	Material .....	21
3.1.1	Lipophile Matrices.....	21
3.1.2	Tenside .....	22
3.1.3	Zusätzliche pharmazeutische Hilfsstoffe .....	23
3.1.4	Aktive pharmazeutische Substanzen .....	23
3.1.4.1	KuRei300 .....	23

3.1.4.2	Weitere Wirkstoffe .....	23
3.1.5	Wasser, Lösungsmittel, Chemikalien .....	26
3.1.6	Filter .....	27
3.2	Methoden .....	28
3.2.1	Herstellung der für KuRei300 getesteten Trägersysteme.....	28
3.2.1.1	Lipidfreie Trägersysteme .....	28
3.2.1.2	Lipidbasierte kolloidale Trägersysteme.....	28
3.2.1.3	Herstellung der mischmizellaren Formulierung für die <i>In-vivo</i> -Studien.....	29
3.2.2	Herstellung der Dispersionen für die Untersuchung zur Wirkstofflokalisation ....	30
3.2.2.1	Herstellung der Nanoemulsionen .....	30
3.2.2.2	Erzeugung der Nanosuspensionen.....	31
3.2.2.3	Einstellung des Poloxamergehalts durch Dialyse .....	31
3.2.2.4	Einstellung der Trimyristinkonzentration .....	31
3.2.2.5	Nomenklatur.....	32
3.2.3	Löslichkeitsversuche mit KuRei300 .....	32
3.2.4	Passive Beladung.....	33
3.2.4.1	Vorlage der Wirkstoffe .....	33
3.2.4.2	Inkubation.....	33
3.2.4.3	Filtration .....	33
3.2.4.4	Ermittlung und Auswertung der Beladung.....	35
3.2.5	Erzeugung der Wirkstoffbeschichtungen.....	36
3.2.5.1	Mehrkanal-Evaporator .....	36
3.2.5.2	Evakuierbare Zentrifuge (SpeedVac).....	36
3.2.6	Bestimmung der Löslichkeit verschiedener Wirkstoffe in MCT .....	37
3.2.7	Physikochemische Untersuchungsmethoden .....	38
3.2.7.1	Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) .....	38
3.2.7.2	Polarisationslichtmikroskopie und Heitzischmikroskopie.....	38
3.2.7.3	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	38
3.2.7.4	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) .....	38
3.2.7.5	Weitwinkelröntgenbeugung (WAXD) .....	39



3.2.7.6	pH-Wert-Messung .....	40
3.2.8	Chromatographische und spektroskopische Untersuchungsmethoden.....	40
3.2.8.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	40
3.2.8.2	UV-Spektroskopie .....	41
3.2.8.3	Protonen-Kernspinresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -NMR).....	41
3.2.8.4	Statistische Analyse .....	41
3.2.9	<i>In-vivo</i> -Studien.....	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>43</b>
4.1	Weiterentwicklung der passiven Beladung .....	44
4.1.1	Hintergrund.....	44
4.1.2	Entwicklung der Wirkstoffbeschichtungen.....	45
4.1.3	Optimierung des Herstellungsverfahrens für die Beschichtungen .....	47
4.1.4	Ansätze für die weitere Miniaturisierung der passiven Beladung .....	48
4.2	Präklinische Formulierung von KuRei300.....	50
4.2.1	Hintergrund der galenischen Aufgabenstellung .....	50
4.2.1.1	Applikationsproblematik in zurückliegenden <i>In-vivo</i> -Studien.....	50
4.2.1.2	Anforderungen an die zu entwickelnde Formulierung .....	51
4.2.2	Physikochemische Charakterisierung von KuRei300 .....	52
4.2.2.1	Untersuchungen zur Löslichkeit.....	52
4.2.2.2	Stabilitätsuntersuchung in Lösung .....	53
4.2.2.3	Strukturaufklärung des Lagerproduktes in Lösung.....	54
4.2.3	Suche eines geeigneten Trägersystems .....	56
4.2.3.1	Vorversuche .....	56
4.2.3.2	Trägersysteme .....	57
4.2.4	Einfluss des physikochemischen Zustands von KuRei300 auf die Höhe der Beladung .....	59
4.2.5	Charakterisierung des physikalischen Zustands der Beschichtungen .....	60
4.2.5.1	Parameter bei der Beschichtungsherstellung .....	60
4.2.5.2	WAXD .....	61

4.2.5.3	DSC und Heitzschmikroskopie .....	61
4.2.6	Einfluss der Beschichtung auf die Beladungsgeschwindigkeit .....	65
4.2.7	Auswahl des Trägersysteme für die <i>In-vivo</i> -Studien .....	66
4.2.8	Stabilität der mit KuRei300 beladenen Mischmizellen.....	68
4.2.8.1	Chemische Stabilität von KuRei300.....	68
4.2.8.2	Physikalische und mikrobiologische Stabilität der Zubereitung .....	70
4.2.9	<i>In-vivo</i> -Studien.....	70
4.3	Lokalisation von Wirkstoffen in lipidbasierten Nanoemulsionen und Nanosuspensionen .....	72
4.3.1	Nachteile der spektroskopischen Methoden .....	72
4.3.2	Arbeitshypothese.....	73
4.3.3	Wahl der Dispersionssysteme und der Wirkstoffe.....	74
4.3.4	Entwicklung der Dispersionen.....	75
4.3.5	Eigenschaften der unbeladenen Dispersionen.....	76
4.3.5.1	Aussehen .....	76
4.3.5.2	Physikochemische Charakterisierung und Partikelgrößenbestimmung .....	77
4.3.5.3	Stabilität bei unterschiedlichen pH-Werten .....	80
4.3.6	Passive Beladung .....	80
4.3.6.1	Beschichtungen.....	80
4.3.6.2	Wirkstoffadsorption an Filtermembranen .....	81
4.3.6.3	Trimyristingehalt der beladenen Dispersionen .....	82
4.3.7	Physikochemische Charakterisierung der beladenen Dispersionen .....	83
4.3.7.1	Partikelgrößen und pH-Werte .....	83
4.3.7.2	Physikalischer Zustand nach der Beladung .....	85
4.3.8	Solubilisierungsergebnisse .....	85
4.3.8.1	Löslichkeit in der wässrigen Phase.....	85
4.3.8.2	Solubilisierung durch Trimyristinnanopartikel.....	85
4.3.8.3	Korrelation der Beladungshöhe von Wirkstoffen in den Emulsionen mit der Löslichkeit in MCT .....	96
4.3.8.4	Lagerstabilität der beladenen Dispersionen.....	97

4.3.8.5	Absenkung der Kristallisationstemperatur von Trimyristin in beladenen Emulsionen .....	98
4.4	Geschwindigkeit und mechanistische Aspekte der passiven Beladung .....	100
4.4.1	Geschwindigkeit .....	100
4.4.2	Überlegungen zum Mechanismus der passiven Beladung.....	102
<b>5</b>	<b>Abschlussdiskussion.....</b>	<b>106</b>
5.1	Passive Beladung .....	106
5.1.1	Grundlagen.....	106
5.1.2	Anwendung .....	108
5.2	Lokalisation von Wirkstoffen in flüssigen und festen Lipidnanopartikeln .....	112
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>Referenzen.....</b>	<b>119</b>
<b>A</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>138</b>
A 1	<sup>1</sup> H-NMR-Spektrum von KuRei300 .....	138
A 2	pH-Werte der Pufferuntersuchungen für Trimyristinemulsionen .....	138
A 3	Quantifizierung von Trimyristin mit DSC .....	139
A 3.1	Vergleich DSC und HPLC-UV.....	139
A 4	Quantifizierung von Trimyristin mit HPLC-ELSD .....	140
A 4.1	Vergleich von UV-Detektor und ELSD .....	141
A 4.2	Alternative mobile Phase .....	145
A 4.3	Externe Beheizung des Verneblers.....	146
A 4.4	Optimierung von Analytmenge und Injektionsvolumen.....	147
A 4.5	Vergleich von ELSD und CAD .....	148
A 4.6	Schlussfolgerungen für die Lipidquantifizierung mit HPLC-ELSD .....	149



## Glossar und Abkürzungen

$^1\text{H-NMR}$	Proton Nuclear Magnetic Resonance, Protonenker <span>ns</span> pinresonanz
ACN	Acetonitril
CMC	Critical Micelle Concentration, kritische Mizellbildungskonzentration
Cut Off	Ausschlussgrenze eines Filters
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Differential Scanning Calorimetry, Dynamische Differenzkalorimetrie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector, Verdampfungslichtstreudetektor
FDA	Food and Drug Administration, US-amerikanische Behörde für Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassung
HLB	Hydrophilic Lipophilic Balance, Kenngröße für Tenside
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigchromatographie
IR	Infrarot(strahlung)
LAF	Laminar Air Flow, laminarer Luftstrom unter der Reinraumwerkbank
logP	dekadischer Logarithmus des <i>n</i> -Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molecular Weight Cut Off, Ausschlussgröße des Molekulargewichtes
n	Stichprobenanzahl
p.a.	pro analysi, für die Analyse
PCS	Photon Correlation Spectroscopy, Photonenkorrelationsspektroskopie
PdI	Polydispersitätsindex
pK <sub>a</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RSD	Relative Standard Deviation, relative Standardabweichung
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
THF	Tetrahydrofuran
T <sub>s</sub>	Schmelztemperatur



# 1 Einleitung und Problemstellung

Die schlechte Wasserlöslichkeit vieler neu synthetisierter Wirkstoffe und Wirkstoffkandidaten ist eine große Herausforderung für die Entwicklung pharmazeutischer Formulierungen [1–3]. Eine von vielen Möglichkeiten hydrophobe Substanzen zu solubilisieren, kann der Einsatz lipidbasierter kolloidaler Trägersysteme sein. Eine ganze Reihe von Arzneimitteln auf der Basis solcher Trägersysteme ist bereits zugelassen. Beispiele für in Deutschland zugelassene Präparate sind Propofol-®Lipuro (Propofol), AmBisome® (Amphotericin B), Sandimmun® (Ciclosporin) und Konakion® MM (Phytomenadion) [4]. Neben solch etablierten Systemen wie kolloidalen Fettemulsionen, Liposomen oder mischmizellaren Lösungen werden weitere auf ihre Eignung für pharmazeutische Zwecke untersucht. Dazu zählen unter anderem Dispersionen fester und flüssigkristalliner Lipidnanopartikel [5,6].

Das Problem der schlechten Wasserlöslichkeit muss nicht erst zum Zeitpunkt der Markteinführung eines Wirkstoffs überwunden werden. Mit unzureichend oder ungeeignet solubilisierten Substanzen können weder *In-vitro*- noch *In-vivo*-Studien aussagekräftige Ergebnisse zu Toxizität und Wirksamkeit liefern. Die frühzeitige Identifizierung von geeigneten Trägersystemen ist somit eine essenzielle Voraussetzung für die Entwicklungsfähigkeit von vielversprechenden Wirkstoffkandidaten [2].

Klassischerweise erfolgt das Einbringen der schwer wasserlöslichen Substanzen während der Herstellung der Trägersysteme. Bei kolloidalen Fettemulsionen beispielsweise besteht eine übliche Methode darin, die Substanz in der gegebenenfalls erwärmten Lipidphase zu lösen und diese Mischung weiterzuverarbeiten („*De-novo*-Herstellung“) [7,8]. Nachteilig ist dabei, dass die maximale Beladung des Systems durch ein iterierendes Verfahren ermittelt werden muss. Weist das fertige Produkt nach der Herstellung überschüssigen kristallinen Wirkstoff auf, so wurde die Beladungsgrenze überschritten und der nächste Ansatz muss mit weniger Wirkstoff erfolgen. Diese Vorgehensweise ist mit verschiedenen Problemen behaftet. Neben dem Zeitaufwand stehen an erster Stelle der hohe Verbrauch von Wirk- und Hilfsstoffen. Gerade im sehr frühen Entwicklungsstadium potentieller Wirkstoffe ist die verfügbare Substanzmenge jedoch ein limitierender Faktor [3]. In den Trägersystemen eingesetzte Hilfsstoffe, wie etwa Gallensalze oder hochreine Phospholipide, können zudem sehr hochpreisig sein. Von galenischer Seite muss bei dieser Art der Wirkstoffearbeitung darüberhinaus mit Überladung gerechnet werden, die sich auch mit starker zeitlicher Verzögerung zeigen kann [9]. Je nach Herstellungsmethode des jeweiligen Trägersystems wird der Wirkstoff außerdem thermisch belastet oder es werden organische Lösungsmittel eingetragen, deren vollständige Entfernung gewährleistet sein muss. Schließlich stellt die Verarbeitung von mutagenen, cancerogenen und reproduktionstoxischen Wirkstoffen, einer

häufig schlecht wasserlöslichen Gruppe, aus Arbeitsschutzgründen eine erhebliche Herausforderung dar.

Aus den angeführten Gründen ist ein alternatives Verfahren zur Identifikation von Trägersystemen und der Bestimmung ihrer Beladungskapazität wünschenswert. Rosenblatt und Bunjes stellten eine passive Beladungsmethode vor, bei der der Wirkstoff mit einem bereits vorgefertigten Trägersystem inkubiert wird [10]. Nach der Inkubation wird nicht solubilisierter Substanzüberschuss entfernt und die im Trägersystem solubilisierte Menge quantifiziert. Es gelang auf diese Weise, Dispersionen unterschiedlicher Lipidnanopartikel mit schwer wasserlöslichen Wirkstoffen wie Betamethasonvalerat, Diazepam oder Carbamazepin zu beladen [10]. Für Ubidecarenon und Retinylpalmitat, zwei Wirkstoffe die sich durch *De-novo*-Herstellung gut einarbeiten lassen [9,11], gelang es allerdings nicht [10]. Die vorliegende Arbeit knüpft an die vorangegangenen Ergebnisse an und befasst sich einerseits mit der praktischen Nutzbarkeit der passiven Beladung und andererseits mit ihren physikochemischen Grundlagen.

Unter der Maßgabe der praktischen Nutzung sollte die passive Beladung als substanz- und trägersystemsparendes Screening-Instrument für den Labormaßstab etabliert werden. Eingebunden war dieser Teil der Arbeit in eine interdisziplinäre Kooperation mit dem Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Universität Braunschweig und dem Kuvim Center for Study of Infectious and Tropical Diseases der Hebrew University. Ein konkretes Ziel war hierbei die Identifikation eines (lipidbasierten) kolloidalen Trägersystems für die antileishmanielle Substanz KuRei300. Diese Substanz sollte in eine parenteral applizierbare Darreichungsform formuliert werden, um aussagekräftige *In-vivo*-Studien zu ermöglichen.

Hinsichtlich des Beladungsvorgangs selbst sollte ein besseres Verständnis für die ablaufenden Mechanismen entwickelt werden. Von Interesse war unter anderem, ob sich seitens des Wirkstoffs und des Trägersystems Faktoren identifizieren lassen, die bedeutend für eine erfolgreiche passive Beladung sind. Eine weitere Frage war, ob die Wirkstoffüberladung eines Trägersystems mit der passiven im Gegensatz zur klassischen Beladung tatsächlich verhindert werden kann.

Vertiefend untersucht wurden darüberhinaus Lipidnanoemulsionen und Dispersionen fester Lipidnanopartikel im Hinblick auf Wechselwirkungen mit Wirkstoffmolekülen. Obwohl erstere seit langem als Wirkstoffträger kommerziell etabliert sind und letztere intensiv beforscht werden, liegen teilweise widersprüchliche Angaben zur Lokalisation der Wirkstoffe vor. Verbesserte Kenntnisse hierzu sind allerdings notwendig, wenn diese beiden Trägersysteme gezielt weiterentwickelt werden sollen. Im Rahmen der passiven Beladung sollte herausgefunden werden, welchen Einfluss Partikelgröße und -oberfläche sowie der physikalische Zustand der Partikel auf die maximale Beladung haben. Daraus sollten Aussagen über die Lokalisation der solubilisierten Wirkstoffe abgeleitet werden.



## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Strategien zur Formulierung schlecht wasserlöslicher Wirkstoffe

Ein großer Teil der neu synthetisierten pharmazeutischen Wirkstoffkandidaten und Wirkstoffe ist sehr schlecht wasserlöslich [1]. Weil der molekulardisperse Zustand des Wirkstoffmoleküls eine notwendige Voraussetzung für seine Bioverfügbarkeit ist, stellt die schlechte Wasserlöslichkeit ein zentrales Problem dar. Es werden daher zahlreiche Ansätze verfolgt, um Löslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit hydrophober Substanzen zu verbessern. Auf chemischer und physikochemischer Ebene zählen dazu die Synthese von Prodrugs [12], Salz- und Co-Kristallbildung sowie die Umwandlung in vorteilhafte Modifikationen [13]. Ansätze von galenischer Seite bestehen im Einsatz von Co-Solventien und Tensiden [14], der Verwendung von Cyclodextrinen [15] sowie der Herstellung von nanokristallinen Wirkstoffsuspensionen [16] und festen Dispersionen [17]. Tabelle 2-1 gibt einige Produktbeispiele für die Anwendung der genannten Prinzipien.

Besonders die Formulierung mit Hilfe von organischen Lösungsmitteln wie Ethanol oder Polyethylenglycolen als Co-Solventien, lösungsvermittelnden Tensiden wie Polysorbaten oder Macrogolglycerolricinoleat und/oder der Einstellung eines geeigneten pH-Wertes ist verhältnismäßig wenig aufwendig. Diese Maßnahmen haben jedoch gravierende Nachteile.

**Tabelle 2-1:** Produktbeispiele für verschiedene Formulierungsprinzipien für schlecht wasserlösliche Wirkstoffe. Alle aufgeführten Produkte sind in Deutschland zugelassen [4]. Partikuläre Trägersysteme sind nicht aufgeführt.

Name	Wirkstoff	Prinzip	Form	Quelle
Dolormin <sup>®</sup> Extra	Ibuprofen als DL-Lysinsalz	leicht lösliches Salz	FTA	[18]
Faustan <sup>®</sup>	Diazepam	Co-Solventien, Lösungsvermittler (Ethanol, Macrogol 400)	ILO	[19]
Ivemend <sup>®</sup>	Fosaprepitant-Dimeglumin	Prodrug	PIF	[20]
Lipidil 145 One <sup>®</sup>	Fenofibrat	Nanokristalle des Wirkstoffs	FTA	[21]
Prograf <sup>®</sup>	Tacrolimus	feste Dispersion	KPS	[17,22]
Taxomedac <sup>®</sup>	Paclitaxel	Co-Solvens, Tensid (Macrogolglycerolricinoleat, Ethanol)	IFK	[23]
Vfend <sup>®</sup>	Voriconazol	Einschlussverbindung mit Cyclodextrin (Natrium- $\beta$ -cyclodextrin-sulfobutylether)	PIF	[24]

FTA: Filmtablette, ILO: Injektionslösung, PIF: Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung, KPS: Hartkapsel, IFK: Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung

Zum einen besteht das Risiko der Wirkstoffpräzipitation bei Verdünnung der Formulierung im Blut oder bereits bei der Herstellung der applikationsfertigen Zubereitung. So enthält die Fachinformation von Taxomedac® den Hinweis, dass in der rekonstituierten Infusion Kristalle auftreten können und sie unter Verwendung eines Filters infundiert werden soll [23]. Zum anderen sind selbst für die parenterale Anwendung zugelassene Tenside und Lösungsvermittler teilweise toxikologisch nicht unbedenklich [2]. Das immer noch eingesetzte Tensid Macrogolglycerolricinoleat (früher Cremophor® EL, jetzt Kolliphor® EL) kann beispielsweise schwerwiegende anaphylaktische Reaktionen wie Luftnot, Tachykardie und Angioödeme auslösen [14]. Kolloidale Trägersysteme können eine Möglichkeit sein, diese genannten Probleme zu umgehen.

### 2.1.1 Kolloidale Trägersysteme

Allgemein werden als Kolloide disperse Systeme bezeichnet, bei denen die disperse Phase aus Nanopartikeln im Größenbereich von etwa 1 bis 500 nm besteht [25]. Kolloidale Trägersysteme für pharmazeutische Zwecke enthalten in einem wässrigen Dispersionsmedium entsprechend wirkstofftragende Partikel, wobei in wissenschaftlichen Veröffentlichungen durchaus Partikelgrößen bis etwa 1000 nm mit einbezogen werden. Wenn die verwendeten Hilfsstoffe die toxikologischen Anforderungen erfüllen und die Partikel entsprechend klein sind, sind diese Trägersysteme für alle Applikationswege einschließlich den intravenösen geeignet. Neben der bloßen Solubilisation schwer wasserlöslicher Wirkstoffe können mit Hilfe der kolloidalen Partikel weitere Effekte erzielt werden. Dazu zählt die Veränderung der Biodistribution von Wirkstoffen und die damit verbundene Erhöhung ihrer Wirksamkeit und Reduktion der Toxizität. Beispielsweise werden kolloidale Partikel geeigneter Größe in der Regel von Zellen des retikuloendothelialen Systems aufgenommen und reichern sich so in Leber und Milz an [26,27]. Ebenfalls eine Form des passiven Targetings ist die Anreicherung von Nanopartikeln in Tumorgewebe auf Grund des sogenannten EPR-Effekts (EPR: enhanced permeability and retention). Er beruht darauf, dass einerseits das Endothel der Kapillaren im Tumor erhöht durchlässig und andererseits die Lymphdrainage vermindert ist [28,29]. Um den EPR-Effekt zu nutzen, ist es vorteilhaft, wenn die Nanopartikel lange im Blut zirkulieren können. Als geeignet für die Erhöhung der Zirkulationszeit hat sich die PEGylierung der Partikeloberflächen erwiesen, da sie die Opsonierung vermindert [30]. Neben dem passiven ist auch aktives Targeting für bestimmte Zielstrukturen möglich, indem die Oberfläche der Nanopartikel mit entsprechenden Liganden versehen wird [31]. Ein weiterer möglicher Vorteil kolloidaler Wirkstoffträger ist die chemische Stabilisierung von Wirkstoffen [32].

Eine vielfältige Gruppe von Arzneistoffträgern, die stark im Fokus der Forschung steht, sind Polymernanopartikel. Sie können sowohl aus synthetischen als auch aus natürlichen

Polymeren hergestellt werden. Hydrophobe Wirkstoffe können in die Polymermatrix eingebettet oder kovalent gebunden, aber auch im Kern eines Partikels eingeschlossen sein (Nanokapsel) [33]. Wenn keine vorgefertigten Polymere eingesetzt, sondern die Partikel *in-situ* hergestellt werden, können organische Rückstände oder verbliebene Monomere toxikologisch problematisch sein. Zudem muss bei nicht bioabbaubaren Polymeren geklärt werden, welchem Schicksal sie im Körper unterliegen. Die Toxizitätsproblematik ist ein Grund, warum bisher trotz zahlreicher Forschungsarbeiten [34] noch kein Produkt mit synthetischen Polymernanopartikeln als Träger für schwer wasserlösliche Wirkstoffe zugelassen ist [33].

Eine andere Art von kolloidalem Trägersystem auf der Grundlage von Polymeren sind Polymermizellen. Dabei bilden amphiphile Polymermoleküle in einer wässrigen Phase Assoziationskolloide und können hydrophobe Wirkstoffe in ihrem Kern beherbergen. In einigen asiatischen Ländern ist eine Formulierung mit Paclitaxel bei verschiedenen Krebserkrankungen mit den Namen Genexol-PM<sup>®</sup> und Paxus-PM<sup>®</sup> bereits zugelassen; in den USA wird aktuell die Anerkennung durch die Zulassungsbehörde FDA (Food and Drug Administration) unter dem Namen Cynviloq<sup>®</sup> angestrebt [35,36]. Formulierungen weiterer zytostatischer Wirkstoffe befinden sich in klinischen Studien [36].

Bereits im Jahr 2005 wurde erstmalig die kolloidale Zubereitung Abraxane<sup>®</sup> in den USA bei metastasierendem Brustkrebs zugelassen [37], seit 2008 ist sie auch in Deutschland verfügbar [4,38]. Sie enthält Paclitaxel, das in Nanopartikeln verkapselt ist, die aus dem globulären Protein Albumin bestehen. Albumin kommt unter anderem auch im menschlichen Plasma vor und fungiert dort als wichtiger Träger für schwer wasserlösliche Substanzen. Neben der Verkapselung ist es auch möglich, Wirkstoffe oder deren Prodrugs kovalent an Albumin zu binden [37].

Eine weitere, strukturell sehr interessante Art kolloidaler Partikel sind Dendrimere. Dabei handelt es sich um hochverzweigte, synthetische, monodisperse Makromoleküle mit kugelförmiger Gestalt [39]. Schwer wasserlösliche Wirkstoffe können mit dem Kern des Moleküls oder hydrophoben Kompartimenten der Zweige interagieren oder auch kovalent an ein Dendrimer gebunden werden. Es sind Dendrimere mit verschiedenen Zytostatika, Antiinfektiva und Antiphlogistika hergestellt und teilweise auch *in-vivo* evaluiert worden, aber die klinische Datenlage ist noch spärlich [40]. In Australien befindet sich das wirkstofffreie, dendrimerhaltige Gel VivaGel<sup>®</sup> in der klinischen Prüfung für die Behandlung und Prophylaxe der bakteriellen Vaginose. Als zusätzliche Beschichtung für Kondome ist es bereits zugelassen [41,42].

Die hier erfolgte Vorstellung kolloidaler Trägersysteme ist keinesfalls abschließend. Eine weitere, im klinischen Alltag bereits sehr bedeutsame Gruppe sind lipidbasierte kolloidale

Dispersionen. Da einige von ihnen im Zentrum der vorliegenden Arbeit stehen, werden sie im folgenden Unterkapitel gesondert beschrieben.

## **2.2 Lipidbasierte kolloidale Dispersionen als Wirkstoffträgersysteme**

Auch lipidbasierte kolloidale Dispersionen sind eine vielfältige Gruppe von Wirkstoffträgersystemen. Die Dispersionspartikel können sowohl flüssig [43], fest [44] als auch flüssigkristallin [45] sein oder flüssige und feste Komponenten gleichzeitig [46] enthalten. Auch strukturell unterscheiden sich Partikel wie beispielsweise Liposomen, Emulsionstropfen oder kubische Nanopartikel stark [47]. Ihnen gemein ist, dass sie Fette wie Phospholipide, Glyceride und Wachse natürlichen oder (partial)synthetischen Ursprungs enthalten [5,48]. Häufig sind die Partikel zur Stabilisierung von einer Tensidhülle umgeben. Je nach Trägersystem ist die Formulierbarkeit eines schwer wasserlöslichen Wirkstoffs davon abhängig, ob er eine ausreichende Affinität zur lipophilen Matrix besitzt oder sich in Grenzflächen oder Membranstrukturen aufhalten kann. Selbstverständlich müssen auch lipidbasierte kolloidale Trägersysteme Toxizitätsstudien unterzogen werden. Im Allgemeinen gelten sie aber als physiologisch weniger kritisch als (synthetische nicht bioabbaubare) Polymernanopartikel [33].

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stehen sowohl die kommerziell etablierten Systeme Emulsion und liposomale sowie mischmizellare Dispersion als auch Dispersionen fester, kubischer und unterkühlt-smektischer Lipidnanopartikel, die noch keine zugelassenen Wirkstoffträger sind. Sie werden jeweils im Einzelnen vorgestellt. Darüberhinaus gibt es weitere lipidbasierte kolloidale Systeme, die für pharmazeutische Zwecke eingesetzt oder geprüft werden.

Hexosomen beispielsweise basieren, so wie kubische Nanopartikel, auf einer lyotropen flüssigkristallinen Phase. Es finden sich *in-vitro*-Studien, in denen sie als Trägersysteme für Wirkstoffe wie Vitamin K und Progesteron auf tierischer Haut oder Schleimhaut getestet wurden [49].

Nanostrukturierte Carrier (nanostructured lipid carriers, NLC) sind Partikel, die aus einer Mischung von flüssigen und feste Lipiden bestehen. Sie wurden vor allem mit der Absicht entwickelt, die Beladungskapazität für Wirkstoffe und die spätere Freisetzung im Vergleich zu festen Lipidnanopartikeln zu verbessern [46]. Entgegen der anfänglich postulierten Vorstellung von fein verteilten, wirkstoffhaltigen Öltröpfchen in einer festen Lipidmatrix stellten sich nanostrukturierte Carrier jedoch als flache Lipidplättchen mit Ölanhaftungen an der Oberfläche heraus [50,51]. Obwohl sie mit diversen Wirkstoffen beladen werden können, sind sie weit entfernt vom Eintritt in die klinische Praxis [52].

Eine gewisse strukturelle Besonderheit sind sogenannte Mikroemulsionen. Der Terminus ist insofern irreführend, als dass es sich weder um klassische Emulsionen, noch um Systeme mit Partikeln im Mikrometerbereich handelt. Mikroemulsionen sind thermodynamisch stabile, einphasige, optisch isotrope Systeme [53], die sowohl hydrophile, hydrophobe als auch amphiphile Wirkstoffe solubilisieren können. Selbst-mikroemulgierende Wirkstoffträgersysteme (SMEDDS: self-micro emulsifying drug delivery systems) sind gewissermaßen die wasserfreie Vorstufe einer Mikroemulsion [54]. Diese isotropen Mischungen aus einem fetten Öl, Tensiden, wasserlöslichen Co-Solventien und dem schwer wasserlöslichen Wirkstoff bilden bei Kontakt mit Wasser spontan eine Mikroemulsion. Sowohl Mikroemulsionen als auch SMEDDS werden als Trägersysteme für verschiedene Wirkstoffe und Applikationsrouten getestet, aber zugelassene Präparate finden sich noch wenige [54,55]. Ein prominentes Beispiel für ein SMEDD ist das Ciclosporin-Präparat Sandimmun® Optoral<sup>1</sup>, das in Deutschland als Lösung zum Einnehmen sowie als Weichkapsel erhältlich ist [4].

### 2.2.1 Lipidnanoemulsionen

Öl-in-Wasser-Emulsionen sind disperse Systeme, bei denen in einer wässrigen Phase feine Öltröpfchen dispergiert sind, die von einer Emulgatorhülle stabilisiert werden [43]. Bereits seit Beginn der 1960er Jahre werden kolloidale Triglyceridemulsionen als Lipidquelle bei der parenteralen Ernährung eingesetzt [57]. Sie sind beispielsweise unter Namen wie Lipofundin®, Intralipid® oder Omegaven®-Fresenius im Handel und enthalten in der Regel zwischen 10 und 20 % Fett [4]. Auf Grund ihrer ausgezeichneten physiologischen Kompatibilität wurden und werden Lipidnanoemulsionen außerdem als Trägersysteme für schwer wasserlösliche Wirkstoffe untersucht und eingesetzt. Für die parenterale Applikation sind in Deutschland momentan Zubereitungen mit Etomidat (Etomidat®-Lipuro), Propofol (Disoprivan®), Diazepam (Diazepam®-Lipuro), einer Mischung fettlöslicher Vitamine (Vitalipid®) und Dexamethason-21-palmitat (Lipotalon®) zugelassen [4]. Wenn sie als parenterale Arzneimittel angewendet werden, kommen für Lipidnanoemulsionen nur entsprechend zugelassene Hilfsstoffe in Frage. Für die Lipidphase sind das als Einzelkomponente oder Mischung fette Pflanzenöle wie Sojaöl oder Distelöl, mittelkettige Triglyceride sowie Fischöl. Als Emulgator wird in erster Linie Lecithin verwendet, dem freie Fettsäuren wie Ölsäure zur chemischen Stabilisierung zugesetzt werden können [8]. In der Grundlagenforschung werden als Matrixlipide auch Alkane [58] und synthetische monoacidische Triglyceride mit kürzeren [59] oder längeren Fettsäureketten [60] untersucht. Für die Stabilisierung sind eine ganze Reihe von Emulgatoren wie Poloxamer 188, Natriumdodecylsulfat, Zuckerester [61], Macrogol-15-Hydroxystearat [62] oder Tyloxapol [63]

<sup>1</sup> In der englischsprachigen Literatur ist meist der Name Neoral® zu finden, weil es von der FDA unter diesem Namen zugelassen ist [56].

geeignet. Für die Herstellung von Lipidnanoemulsionen für pharmazeutische Zwecke wird in der Regel zunächst aus beiden – gegebenenfalls erwärmten – Phasen mit einem Dispergierwerkzeug eine Präemulsion hergestellt. Anschließend wird die Tröpfchengröße durch Hochdruckhomogenisation [8,60,62] weiter reduziert. Eine Alternative, die ohne hohe Drücke auskommt, ist die Membranemulgierung [61]. Die erzielten Tröpfchengrößen liegen in etwa zwischen 100 und 1000 nm, wobei für die parenterale Anwendung Tröpfchen von unter 500 nm wünschenswert sind [8].

Neben der Solubilisierung schwer wasserlöslicher Wirkstoffe können Lipidnanoemulsionen weitere vorteilhafte Eigenschaften besitzen. Beispielsweise reduzieren sie im Vergleich zu anderen Vehikeln Schmerzen und Irritationen an der Injektionsstelle [64,65], mindern die Wirkstofftoxizität [66,67] oder schützen inkorporierte Wirkstoffe gegen chemische Degradation [32,68]. Wie andere Nanopartikel können auch Emulsionstropfen durch das Anbringen von Antikörpern funktionalisiert und für ein Targeting genutzt werden [69]. Kaum geeignet sind sie hingegen für die verzögerte Wirkstofffreisetzung. Untersuchungen zeigten, dass Wirkstoffe eine hohe Mobilität in der Lipidmatrix besitzen [9] und bei Verdünnung bereits *in-vitro* schnell abdiffundieren [70–72]. Es wird vermutet, dass eine Substanz erst bei einem logP über 9 in der Emulsion verbleibt [73].

Bei unzureichender Solubilisierungskapazität der verbreiteten triglyceridbasierten Nanoemulsionen können Tocolemulsionen eine Alternative sein. Bei diesen kolloidalen Emulsionen besteht die disperse Phase aus Vitamin-E-Derivaten. Es gelang mit diesen Systemen unter anderem, Paclitaxel und Ciclosporin zu formulieren [74].

### 2.2.1.1 Dispersionen isotroper unterkühlter Schmelzen

Eine Besonderheit stellen Lipidnanoemulsionen dar, bei denen die disperse Phase in Form einer isotropen unterkühlten Schmelze vorliegt [9,60,75]. Als Unterkühlung bezeichnet man die Temperaturdifferenz zwischen der Schmelztemperatur und der Temperatur der anschließenden Kristallisation einer Substanz. Sehr gut wurden diesbezüglich monoacidische Triglyceride mit den gesättigten Fettsäuren Laurin-, Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure untersucht. Diese Triglyceride sind bei Raumtemperatur fest ( $T_{S\text{ Lau}} = 47^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{S\text{ Myr}} = 56^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{S\text{ Pal}} = 64^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{S\text{ Ste}} = 73^{\circ}\text{C}$ ) und können in der Hitze mittels Schmelzhomogenisation zu kolloidalen Dispersionen verarbeitet werden [60,75]. Eine Schmelzunterkühlung zeigt sich bereits bei den Bulksubstanzen und nimmt tendenziell mit sinkender Kettenlänge zu [60]. So kristallisieren im dynamischen Abkühlungsprozess Tristearin  $22^{\circ}\text{C}$  und Trilaurin  $36^{\circ}\text{C}$  unter ihrer jeweiligen Schmelztemperatur [60]. Noch ausgeprägter ist die Unterkühlung allerdings, wenn sich die Lipide im kolloidalen Zustand befinden. Die Kristallisationstemperatur der Partikel liegt dann beispielsweise für Tristearin  $38^{\circ}\text{C}$  und für Trilaurin  $51^{\circ}\text{C}$  unter den jeweiligen Schmelztemperaturen [60]. Insgesamt ist

die Kristallisationstemperatur der kolloidalen Emulsionströpfchen im Vergleich zu Bulksubstanzen um etwa 20°C gesenkt. Es ist anzumerken, dass sich bei der Kristallisation zunächst die  $\alpha$ -Modifikation bildet, der Schmelzvorgang dann aber von der  $\beta$ -Modifikation ausgeht [75]. Die starke Unterkühlung im kolloidalen Zustand hat zur Folge, dass schmelzhomogenisierte Nanodispersionen fester Lipide nicht notwendigerweise auch feste Nanopartikel enthalten. Nanopartikel aus Trilaurin und Trimyristin beispielsweise bleiben bei Raumtemperatur flüssig. Es handelt sich somit um Emulsionen. Obwohl dieser Zustand thermodynamisch instabil ist, kann er unter geeigneten Bedingungen über viele Monate und teilweise sogar Jahre aufrecht erhalten werden [60,76]. Flüssige Trimyristinnanopartikel können durch Lagerung im Kühlschrank zur Kristallisation gebracht werden, wohingegen dies bei Trilaurin erst bei deutlich unter 0°C der Fall ist. Die Rekristallisationstendenz von Nanopartikeln aus unterkühlten Triglyceridschmelzen hängt unter anderem von der Partikelgröße, dem Stabilisator, der thermischen Geschichte der Zubereitung und der Präsenz von kristallinem Material in der Dispersion ab [76].

## 2.2.2 Lipidnanosuspensionen

Lipidnanosuspensionen sind nanopartikuläre Dispersionen fester Lipidpartikel verteilt in einer wässrigen Phase [77]. Feste Lipidnanopartikel (Solid Lipid Nanoparticles, SLN) wurden mit der Absicht entwickelt, die Eigenschaften flüssiger oder flüssigkristalliner Partikel zu verbessern. Man versprach sich von ihnen unter anderem eine höhere physikalische und chemische Stabilität, eine größere Beladungskapazität für schwer wasserlösliche Wirkstoffe sowie die Möglichkeit der verzögerten und kontrollierten Wirkstofffreisetzung nach parenteraler Applikation [44,78]. Die ersten Lipidnanosuspensionen wurden zu Beginn der 1990-er Jahre vorgestellt [44,78], wobei im Nachhinein Partikel aus Trilaurin und Trimyristin [78] auf Grund ihrer starken Unterkühlungsneigung mit Vorbehalt betrachtet werden müssen [60]. Grundsätzlich kann die Herstellung analog der kolloidalen Lipidemulsionen erfolgen. Aus der heißen Lipidschmelze und der ebenfalls erwärmten wässrigen Phase wird zunächst eine Vordispersion erzeugt, die Lipidpartikel werden anschließend durch Methoden wie Hochdruckschmelzhomogenisation, Mikrokanalemulgierung, Membranextrusion oder Ultraschall weiter zerkleinert. Das feste Lipid kann auch direkt in der Kälte homogenisiert werden, wenn es zuvor zu Mikropartikeln zermahlen wurde. Es existieren zudem einige weitere Methoden zur Herstellung von Lipidnanosuspensionen, die auf dem Einsatz organischer Lösungsmittel oder/und der Ausfällung der Partikel aus homogenen Systemen beruhen [77,79]. Wenn bei der Herstellung mit einer Lipidschmelze gearbeitet wird, ist die resultierende Dispersion zunächst eine Emulsion. Um feste Lipidnanopartikel zu erhalten, müssen die Lipidtröpfchen zur Kristallisation gebracht werden. Auf Grund der bereits beschriebenen Unterkühlungstendenz einiger Lipide (siehe 2.2.1.1) ist dafür die Abkühlung

auf Raumtemperatur nicht immer ausreichend. Es ist außerdem erwähnenswert, dass Lipide im Zuge der Kristallisation verschiedene Modifikationen durchlaufen können. So kristallisieren beispielsweise Triglyceride in der Regel zunächst in der metastabilen  $\alpha$ -Modifikation und gehen dann in die stabile  $\beta$ -Modifikation über. Faktoren, die den Ablauf der Kristallisation beeinflussen können, sind die Kettenlänge der Fettsäuren des Matrixlipids [75], der Stabilisator [80], die Partikelgröße [81] und auch die Beladung mit Wirkstoffen [9,82]. Sollen feste Lipidnanopartikel pharmazeutisch eingesetzt werden, muss daher der Kristallisationsschritt sehr sorgfältig erfolgen, da in der fertigen Darreichungsform strukturellen Veränderungen unerwünscht sind. In Abhängigkeit von Herstellungsmethode, Stabilisator oder Art und Menge des eingesetzten Lipids sind die Partikel etwa 30 bis 500 nm groß [83]. Die häufig verwendeten Triglyceride bilden dabei meist flache, anisometrische Plättchen ( $\beta$ -Modifikation), die Partikel können aber auch eine kugelförmige Gestalt haben [84]. Als Partikelmatrix kommen feste Glyceride, Fettsäuren, Fettalkohole, Wachse und Paraffine in Frage. Als Stabilisatoren können im Prinzip die gleichen Substanzen eingesetzt werden wie bei kolloidalen Lipidemulsionen auch, also beispielsweise Lecithin, Gallensalze, Poloxamere oder Polysorbate [77]. Besonders wenn bereits zugelassene Hilfsstoffe verwendet werden, sind keine gravierenden Toxizitätsprobleme für Lipidnanosuspensionen zu erwarten. Allerdings gibt es aus *In-vitro*-Studien Hinweise darauf, dass der feste Zustand der Lipide im Vergleich mit kolloidalen Lipidemulsionen die Zellviabilität negativ beeinflussen kann [85].

In zahlreichen Arbeiten sind feste Lipidnanopartikel mit schwer wasserlöslichen Wirkstoffen beladen worden, die unter anderem Zytostatika, Glucocorticoide und zentral wirksame Substanzen umfassen [77,83]. Im Gegensatz zur angestrebten verzögerten Freigabe der Wirkstoffe aus den festen Lipidnanopartikeln, zeigten in *In-vitro*-Versuche jedoch meist eine sehr schnelle initiale Freisetzung [80,86]. Während Lipidnanoemulsionen seit Jahrzehnten pharmazeutisch genutzt werden, gibt es für Lipidnanosuspensionen noch kein zugelassenes Präparat [52,77]. Als vielversprechende Träger für schwer wasserlösliche Wirkstoffe werden feste Lipidnanopartikel jedoch weiter intensiv auf mögliche Vorteile untersucht.

### 2.2.3 Liposomen

Liposomen sind Vesikel aus Phospholipiddoppelmembranen, die einen wässrigen Kern umschließen. Durch diesen Aufbau können sie hydrophile Wirkstoffe in ihrem wässrigen Inneren, lipophile Wirkstoffe zwischen den Fettsäureketten der Membranen und amphiphile Wirkstoffe an der Membran-Wasser-Grenzfläche solubilisieren [87]. Liposomen sind etablierte und äußerst gut untersuchtes kolloidale Träger [88]. Eine übliche Art der Einteilung bezieht sich auf die Größe und Anzahl der Phospholipiddoppelschichten. Demnach gibt es sogenannte kleine unilamellare (SUV, small unilamellar vesicles, etwa 15 – 100 nm), große



unilamellare (LUV, large unilamellar vesicles, etwa 100 – 1000 nm) und große multilamellare Liposomen (MLV, multilamellar large vesicles, etwa 1 -5 µm) [87]. Die Membranen bestehen hauptsächlich aus Phospholipiden. Diese können natürlichen Ursprungs sein, wie aufgereinigtes und gegebenenfalls hydriertes Lecithin aus Ei oder Soja, aber auch synthetisch mit definierter Fettsäurezusammensetzung wie Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) und Distearoylphosphatidylcholin (DSPC) [48]. Die Membranen lassen sich stabilisieren, indem beispielsweise Phospholipide mit höherer Phasenübergangstemperatur, Cholesterol oder Sphingomyelin zugesetzt werden [88]. Liposomen können vielfältig modifiziert werden, um wünschenswerte Eigenschaften zu erzielen. Zu diesen zählt eine erhöhte Zirkulationszeit von Wirkstoffen im Blut, die anfänglich durch den Zusatz von Gangliosiden erreicht wurde [89,90]. Bedeutend sind heute allerdings Phospholipid-Polyethylenglycol-Derivate, durch deren Zusatz Liposomen sterisch stabilisiert werden und einer verminderten Aufnahme durch das retikuloendotheliale System (RES) unterliegen [30,31,91]. Solche sogenannten PEGylierten Liposomen kommen zum Beispiel im Präparat Caelyx® (Doxorubicin) zum Einsatz [4]. Ein ausgedehntes Forschungsgebiet ist das Targeting gezielter Zellen oder Gewebe mit Liposomen, wozu sich inzwischen auch zahlreiche Zubereitungen in der klinischen Prüfung befinden [88]. Beispielhaft genannt seien größenmoduliertes Organtargeting [27,92], ligandenvermitteltes Targeting [31,88] oder eine gesteuerte Wirkstofffreisetzung [31,88]. Liposomen können auf verschiedene Weisen hergestellt werden, wobei durch die Wahl der Methode die Art der entstehenden Liposomen beeinflusst wird. Als klassisch gilt die Filmbildungsmethode. Dabei wird eine organische Lösung von Phospholipiden in einem Kolben verdampft und der entstehende Phospholipidfilm in einer wässrigen Phase aufgenommen. Bereits durch einfaches Schwenken des Kolben bilden sich MLV, die durch nachgeschaltete Verfahren wie Extrusion, Ultraschall oder Hochdruckhomogenisation weiterverarbeitet werden können. Eine weitere Methode ist die Detergenzentfernung, bei der die Phospholipide zusammen mit Tensiden Mischmizellen bilden. Wird in dieser wässrigen Mischmizelllösung beispielsweise durch Verdünnung oder Dialyse die Tensidkonzentration gesenkt, so bilden sich Liposomen [93]. Liposomale Zubereitungen werden zur Verbesserung der physikalischen und chemischen Stabilität der Liposomen häufig gefriergetrocknet [94].

Die erste marktfähige und seit langem bewährte liposomale Formulierung AmBisome® enthält den schwer wasserlöslichen Wirkstoff Amphotericin B. Unter anderem gelang es mit dem Präparat die Nephrotoxizität gegenüber konventionellem Amphotericin B deutlich zu reduzieren [95]. Wie bei Amphotericin B wird auch bei den lipophilen Wirkstoffen Verteporfin und Mifamurtid das Solubilisationsvermögen von Liposomen für schwer wasserlösliche Substanzen ausgenutzt. Verteporfin (Visudyne®) ist ein Benzoporphyrinderivat, das bei altersbezogener, feuchter Makuladegeneration eingesetzt wird. Bei Mifamurtid (Mepact®)

handelt es sich um den Immunmodulator Muramyltripectid-Phosphatidylethanolamin, der selbst ein Phospholipid ist. Er ist indiziert beim Osteosarkom und wird durch die vorteilhafte Formulierung in großen Liposomen besonders rasch von Makrophagen aufgenommen [87]. Nicht der solubilisierende, sondern der verkapselnde Effekt von Liposomen wird bei Zubereitungen wie Caelyx<sup>®</sup> und Myocet<sup>®</sup> (Doxorubicin) oder DaunoXome<sup>®</sup> (Daunorubicin) genutzt, die wasserlösliche Salze der jeweiligen zytostatischen Wirkstoffe enthalten. Bei beiden Anthracyclinen konnte durch die liposomale Darreichungsform die Kardiotoxizität gesenkt werden [96,97].

### **2.2.4 Mischmizellen mit Gallensalzen und Phospholipiden**

Mischmizellen sind Assoziationskolloide aus amphiphilen Molekülen, die mehr als einer Spezies angehören. Physiologisch betrachtet haben Gallensalz-Phospholipid-Mischmizellen herausragende Bedeutung als wichtiger Bestandteil des Gallensaftes. Dieser enthält unter anderem Gallensalze, Cholesterol und Phospholipide, die ungefähr im Verhältnis 16:4:1 Mischmizellen bilden. Diese solubilisieren Produkte der Fettverdauung wie Fettsäuren und Monoglyceride und vermitteln deren Transport und Resorption durch Enterocyten im Dünndarm [98]. Therapeutisch genutzt wird die Fähigkeit von Gallensalzen zur Mischmizellbildung zum Auflösen von Cholesteringallensteinen durch orale Gabe von Ursodeoxycholsäure [99]. Mischmizellare Zubereitungen werden zudem als Trägersysteme zur Solubilisierung von lipophilen oder amphiphilen Wirkstoffen eingesetzt. Dabei kann der Wirkstoff wie beispielsweise Phytomenadion im Präparat Konakion<sup>®</sup> MM in Lecithin-Gallensalz-Mizellen inkorporiert sein [100]. Andererseits kann der Wirkstoff selbst zur Mischmizellbildung mit einem Hilfsstoff führen. Ein interessantes Beispiel hierfür ist Amphocil<sup>®</sup>, bei dem Amphotericin B und Cholesteryl-sulfat relative große (~ 100 nm), scheibenförmige Mischmizellen bilden [101].

### **2.2.5 Unterkühlt-smektische Lipidnanopartikel**

Es gibt Cholesteryl-fettsäureester, die eine thermotrop flüssigkristalline Phase ausbilden können, die als smektische Phase bezeichnet wird. Sie ist dadurch charakterisiert, dass die einzelnen Moleküle an ihrer Längsseite nahezu parallel zueinander ausgerichtet sind [102]. Aus der smektischen Bulkphase wurden wässrige Nanodispersionen entwickelt und diese gezielt im Hinblick auf ihre Eignung als parenterales Trägersystem für schwer wasserlösliche Wirkstoffe untersucht und charakterisiert [103]. Der grundlegende Gedanke war, dass es mit Nanopartikeln der hochviskosen, smektischen Phase gelingen könnte, die vorteilhaften Eigenschaften fester und flüssiger Nanopartikel zu vereinen [103]. Bei Nanosuspensionen sind das die gute physikalische Stabilität und die, zumindest anfänglich postulierte, Wirkstofffixierung an den Partikeln, bei Nanoemulsionen die gute Beladungskapazität der Lipidtröpfchen.

Die gebräuchlichste Art der Herstellung für Dispersionen unterkühlt-smektischer Nanopartikel ist die Hochdruckschmelzhomogenisation einer Präemulsion aus isotroper Lipidschmelze und entsprechend erwärmter, stabilisatorhaltiger wässriger Phase [45,104–106]. Eine zweite Möglichkeit bedient sich ebenfalls der Hochdruckhomogenisation, beinhaltet allerdings die Verwendung eines organischen Lösungsmittels. Bei der lösungsmittelfreien Technik entstehen Partikel mit mittleren Durchmessern von etwa 100 bis 200 nm [45,106]. Die zweite Methode liefert wesentlich kleinere Partikel um 40 nm [45]. Im elektronenmikroskopischen Bild stellen sich beispielsweise mit Gallensalz und Lecithin stabilisierte smektische Nanopartikel überwiegend als Zylinder, seltener als zwiebelartige, kugelförmige Partikel dar [45]. Korrekterweise müssen die Partikel als unterkühlt-smektisch bezeichnet werden, denn bei Raumtemperatur ist das Bulkmaterial der verwendeten Cholesterolester fest. Die Rekristallisationstendenz der Nanopartikel hängt maßgeblich von Stabilisator, Partikelgröße [45,107] sowie Zusammensetzung der Lipidmatrix ab [105]. Sie können ihren unterkühlt-smektischen Zustand über viele Monate bei Lagerung bei 23°C beibehalten [45,105]. Als strukturbildendes Lipid ist Cholesterylmyristat bisher sehr häufig eingesetzt worden [45,85,106], aber auch Cholesterolester mit Pelargon-, Palmitin- und Ölsäure oder Mischungen daraus wurden verarbeitet [105]. Zu den verwendeten Stabilisatoren zählen Lecithin und dessen Kombination mit Natriumglycocholat, Polyvinylalkohol [45] sowie Poloxamer 188 und Poloxamin [104]. An schwer wasserlöslichen Substanzen wurden erfolgreich Ibuprofen, Miconazol, Etomidat und Progesteron eingearbeitet; die drei erstgenannten in der bemerkenswerten Konzentration von 10 % bezogen auf das Lipid [45]. Da Cholesterylfettsäureester physiologischer Bestandteil von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL: low density lipoproteins) sind [108], kann von unterkühlt-smektischen Nanopartikeln eine recht gute Verträglichkeit erwartet werden. In Toxizitätsstudien an Mausfibroblasten erwiesen sich unterkühlt-smektische Nanopartikel aus Cholesterylmyristat/ Poloxamer 188 als nicht toxischer als die parenterale Triglyceridemulsion Lipofundin® MCT [105]. Im Vergleich mit festen Triglyceridnanopartikeln senkten unterkühlt-smektische Nanopartikel zudem – bei Verwendung des gleichen Stabilisators – die Viabilität von Mausfibroblasten deutlich geringer [85]. In weiteren Untersuchungen mit dem Fokus auf der Eignung für die parenterale Darreichung wurde gezeigt, dass unterkühlt-smektische Nanopartikel PEGyliert [109] sowie die Dispersionen autoklaviert werden können [104,109]. Darüberhinaus ist die chemische Stabilität von lecithinstabilisierten Cholesterylmyristatpartikeln geprüft worden und konnte unter anderem durch Pufferung der wässrigen Phase auf pH 7,4 und Zugabe von Natriumglycocholat und EDTA verbessert werden [106].

Dispersionen unterkühlt-smektischer Nanopartikel sind ein sorgfältig charakterisiertes und vielversprechendes Trägersystem für schwer wasserlösliche Wirkstoffe, das durchaus für die parenterale Applikation geeignet scheint. Ein nächster Schritt sollte die *In-vivo*-Evaluation

beinhalten. Ein Blick in die aktuelle Literatur zeigt, dass sich leider bisher offenbar keine anderen Arbeitsgruppen dieses interessanten Trägersystems angenommen haben.

### **2.2.6 Kubische Lipidnanopartikel auf Basis von Monoolein**

Einige amphiphile Lipide wie Monoolein oder Phytantriol können im Überschuss mit Wasser lyotrope flüssigkristalline kubische Phasen ausbilden. Im Folgenden wird ausschließlich auf die invers bikontinuierliche Phase (V2) eingegangen. Bei dieser isotropen, hochviskosen Mesophase trennt eine Lipidmembran zwei kontinuierliche, sich nicht kreuzende Wasserkanalsysteme voneinander ab [110]. Die Lipidmembran ist derart gekrümmt, dass sie unendliche periodische minimale Oberflächen bildet. Bisher sind drei Phasentypen bekannt: D-Typ (double-diamond), G-Typ (gyroid) und P-Typ (primitive) [49]. Unter Zusatz stabilisierender Tenside können auch Nanopartikel mit flüssigkristalliner, kubischer Struktur (Cubosomes®) in wässriger Dispersion hergestellt werden. Häufig geschieht dies durch ein abbauendes Verfahren (top down), indem zunächst die kubische Bulkphase erzeugt und diese anschließend durch Energieeintrag in Form von Ultraschall, Hochdruckhomogenisation oder Scherung dispergiert wird [111]. Wenn Monoolein als strukturbildendes Lipid eingesetzt wird, entstehen dabei zusätzlich auch Vesikel. Sie können durch Hitzebehandlung beseitigt werden [112]. Ein weiteres, aufbauendes Herstellungsverfahren (bottom up) beruht auf einer Art Lipidausfällung durch Lösungsmittelverdrängung [113]. Schließlich gibt es noch sprühgetrocknete Vorstufen kubischer Nanopartikel, die bei Zugabe von Wasser entsprechende Dispersionen bilden [114]. Die Größe kubischer Nanopartikel beträgt etwa 100 bis 400 nm [49]. Ihr struktureller Aufbau macht sie zu einem interessanten Trägersystem für Wirkstoffe, weil sie durch die Existenz von Lipidmembranen und Wasserkanälen lipophile, hydrophile sowie amphiphile Moleküle aufnehmen können. Unter Umständen kann die Beladung mit Wirkstoffen die Struktur der kubischen Phase verändern [49]. Wirkstoffbeladene kubische Nanopartikel wurden unter anderem für die orale [115,116], dermale [117], parenterale [118] und topische Anwendung am Auge [119–121] untersucht; klinische Studien gibt es allerdings noch nicht. Analog zu den Liposomen wird auch bei kubischen Nanopartikeln daran gearbeitet, ihnen gezielt bestimmte Eigenschaften zu verleihen. So wurden bereits kubische Nanopartikel PEGyliert [122,123], um nach intravenöser Applikation eine längere Verweildauer im Blut zu erreichen.

Die möglicherweise bestuntersuchten Dispersionen kubischer Nanopartikel enthalten Monoolein als Matrixlipid und Poloxamer 407 als Stabilisator. Ein solches System wurde auch in dieser Arbeit verwendet. Zu den lipophilen Wirkstoffen, die bereits in Monoolein-Partikel eingearbeitet wurden, zählen Ciclosporin A [119], Cinnarizin [116], Dexamethason [120], Flurbiprofen [121], Simvastatin [115], Indomethacin [117], Chloramphenicol, Diazepam [124] und weitere [125]. Für die Solubilisation schwer

wasserlöslicher Wirkstoffe eignen sich die Partikel demnach gut, für die verzögerte Freisetzung allerdings kaum [124]. Im Hinblick auf ihren möglichen Einsatz als parenterale Darreichungsform wurden in jüngerer Zeit die Wechselwirkungen von kubischen Monoolein-Partikeln mit Schweineblut untersucht. Entgegen älterer Veröffentlichungen scheint die hämolytische Aktivität sehr gering zu sein [126]. Es zeigte sich allerdings auch, dass die Partikel bei Kontakt mit (Schweine)plasma sofort strukturelle Veränderungen erfahren [126], was vermutlich die Wirkstofffreisetzung beeinflussen wird.

## **2.3 Beladung von lipidbasierten kolloidalen Partikeln mit schwer wasserlöslichen Wirkstoffen**

### **2.3.1 Konventionelle Beladung (*de-novo*)**

Unter konventioneller Beladung soll hier die sogenannte *De-novo*-Herstellung [32,127] von Dispersionen wirkstoffhaltiger Lipidnanopartikel verstanden werden. Bei abbauenden Herstellungsverfahren wird dazu der Wirkstoff im Bulklipid gelöst, diese Mischung in der wässrigen Phase vordispersiert und anschließend beispielsweise durch Hochdruck(schmelz)homogenisation weiter zerkleinert. In der wissenschaftlichen Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für diese Vorgehensweise bei der Herstellung von Lipidnanoemulsionen [9,65,66,128,129] sowie Dispersionen fester [9,11,130–132], kubischer [116,117,119,124,125] und unterkühlt-smektischer [45] Nanopartikel mit schwer wasserlöslichen Wirkstoffen. Bei der Herstellung beladener Liposomen werden die Substanzen in der Regel gemeinsam mit den Phospholipiden in einem organischen Lösungsmittel gelöst. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels kann dann der Film aus Phospholipiden und Wirkstoff entsprechend weiter verarbeitet werden [133–136]

### **2.3.2 Passive Beladung**

Prinzipiell ist es auch vorstellbar, Wirkstoffe erst nach Erzeugung der Nanopartikel in die entsprechenden Dispersionen einzutragen. In der englischsprachigen Literatur wird dafür häufig der Begriff „extemporaneous loading“ verwendet. Für parenterale Fettemulsionen finden sich in der älteren Literatur dazu einige Beispiele. Da sich die Emulsionen für die parenterale Ernährung bewährt hatten, gab es Bestrebungen, sie auch als Trägersysteme für die parenterale Applikation schwer wasserlöslicher Wirkstoffkandidaten zu nutzen [137]. In den meisten Fällen wurde die zu formulierende Substanz in einem organischen Lösungsmittel gelöst und diese Mischung dann einer kommerziellen parenteralen Fettemulsion zugefügt [65,68,127,138–141]. Zu den Lösungsmitteln zählten Ethanol [68,138,141], Dimethylacetamid [127,139], N-Methylpyrrolidon [65], DMSO [140], Propylenglycol [141] und Dimethylisosorbid [142]. Es konnten so Zytostatika

[68,127,138,139,141], Benzodiazepine [142], Antibiotika [65], und antiretrovirale [140] Wirkstoffkandidaten formuliert werden, die teilweise für *In-vivo*-Studien am Menschen [138] oder Tier [65] eingesetzt wurden. Ein beschränkender Faktor für den Stoffeintrag ist bei dieser Methode das organische Lösungsmittel, das aus Gründen der Toxizität und der physikalischen Stabilität der Emulsion nur begrenzt zugeführt werden kann. Nachteilig ist zudem, dass der Verdünnungseffekt in der Emulsion zur Präzipitation des Wirkstoffs führen kann [127,138,139].

Gut fettlösliche Wirkstoffe, insbesondere flüssige wie Propofol, können in einigen Fällen ohne Lösungsmittel direkt zu einer vorgefertigten Emulsion gegeben werden [73].

Ein lösungsmittelfreier Prozess für die Beladung von Lipidemulsionen mit festen Wirkstoffen wurde unter dem Namen SolEmuls® vorgestellt [143]. In dem Verfahren wird der Wirkstoff oder eine tensidhaltige Nanosuspension des Wirkstoffs zum Zweck der Solubilisation zusammen mit der Emulsion hochdruckhomogenisiert. Auf diese Weise arbeiteten die Autoren schwer wasserlösliche Azolantimykotika, Carbamazepin und das grenzflächenaktive Amphotericin B in eine parenterale Fettemulsion ein [143,144].

## **2.4 Lokalisation von Wirkstoffen in lipidbasierten Nanoemulsionen und Nanosuspensionen**

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Hinweise auf die Lokalisation von mit flüssigen oder festen Lipidnanopartikeln assoziierten Wirkstoffmolekülen zu bekommen. Obwohl sowohl Lipidnanoemulsionen als auch Dispersionen fester Lipidnanopartikel seit Jahrzehnten vermarktet beziehungsweise erforscht werden, ist diese Frage noch nicht abschließend geklärt. Vermutlich hat die Art der Wirkstoffassoziation mit den Lipidpartikeln jedoch einen Einfluss auf pharmazeutisch relevante Parameter wie die Beladungshöhe, die chemische Stabilität von Wirkstoffen oder die Möglichkeit einer verzögerten Freisetzung. Prinzipiell sind als Aufenthaltsorte für Wirkstoffmoleküle in einer kolloidalen Lipiddispersion mehrere Kompartimente denkbar: Matrix und Grenzflächen der Partikel, die wässrige Phase und zusätzliche kolloidale Strukturen wie (Misch)mizellen oder Liposomen. Dass Fremdmoleküle zwischen der wässrigen Phase und den Lipidpartikeln verteilt vorliegen, wurde sowohl für Emulsionen [58] als auch für Suspensionen [58,145] beschrieben. Bezüglich des exakten Aufenthaltsortes von Wirkstoff- oder Modellmolekülen gibt es unterschiedliche Aussagen. Emulsionströpfchen können offenbar Fremdmoleküle sowohl in ihrem flüssigen Kern [58,146] als auch in der Grenzfläche/Emulgatorschicht [32] oder zwischen beiden Kompartimenten verteilt beherbergen [51,58,62,132,147]. Bei festen Lipidnanopartikeln wurde die Inkorporation von Fremdmolekülen sowohl im Kristallgitter der Lipidmatrix als auch zusätzlich in der Emulgatorhülle beschrieben [145,148]. Es gibt allerdings vermehrt Hinweise darauf, dass sich Fremdmoleküle eher in der Partikelgrenzfläche befinden [9,86,149]. In einer

ganzen Reihe von Arbeiten kommen die Autoren auch klar zu dem Schluss, dass sich der partikelassoziierte Wirkstoffanteil in der Dispersion nicht im Kristallgitter der Partikelmatrix, sondern nahezu ausschließlich in der Partikelgrenzfläche aufhält [51,58,62,132,146,147,150]. Da die Partikel in diesen Studien (bis auf [62]) ausschließlich *de-novo* beladen wurden, bedeutet dies, dass die Fremdmoleküle die Lipidmatrix im Zuge der Kristallisation beim Erkalten der Dispersion verlassen haben müssen.

Bislang wurde die Frage der Wirkstoff-Partikel-Assoziation meist mit technisch sehr aufwendigen Methoden untersucht. Zu ihnen zählen die  $^1\text{H}$ -Kernspinresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie) [9], die Fluoreszenzspektroskopie [51,62,132], die pielektische Spektroskopie [146,149], die Raman-Spektroskopie [51,132] und die paramagnetische Resonanzspektroskopie (auch: Elektronenspinresonanzspektroskopie, EPR- oder ESR-Spektroskopie) [58,145–147,150]. Die letztgenannte Methode wird häufig mit der Aufnahme von Reduktionskinetiken kombiniert, um die Aussagekraft zu erhöhen.

## 2.5 Formulierungsfindung für neue Wirkstoffkandidaten

### 2.5.1 Industrielle Verfahren mit hohem Durchsatz

Der Entstehungsprozess eines neuen Medikaments in der pharmazeutischen Industrie kann ganz grob in die Forschung und die Entwicklung eingeteilt werden [151]. Nach der Identifikation pharmakologisch und toxikologisch interessanter Substanzen werden die möglichen Wirkstoffkandidaten umfangreich physikochemisch charakterisiert [3]. Es werden Eigenschaften erfasst, die Aussagen über Permeabilität, Löslichkeit und Auflösung, Stabilität, Hygroskopizität, Polymorphie und damit letztlich auch Formulierbarkeit erlauben [3]. Wenn sich die neuen Substanzen noch in der Vorauswahl befinden, liegen sie nur in sehr geringen Mengen in ausreichender Reinheit vor. Dennoch ist es sinnvoll, nicht erst nach der Auswahl der Wirkstoffkandidaten in der präklinischen oder sogar zeitigen klinischen Phase mit der Formulierung zu beginnen [2]. Ein starker und frühzeitiger Fokus auf pharmazeutische Formulierbarkeit verhindert, dass erst zu einem relativ späten Zeitpunkt festgestellt wird, dass ein Kandidat nicht weiter entwickelt werden kann [3]. Sowohl in der Wirkstoffforschung als auch –entwicklung werden Charakterisierungsprozesse mit einem sehr hohen Probendurchsatz (high throughput screenings) eingesetzt [151]. Für die Identifikation geeigneter Hilfsstoffe und Trägersysteme für die Löslichkeitsverbesserung von Wirkstoffkandidaten existieren verschiedene Screening-Verfahren [151,152]. Sie zeichnen sich durch Miniaturisierung, (teil)automatisierte Durchführung und damit viele Ergebnisse in kurzer Zeit sowie meist elektronische Verwaltung der erhaltenen Daten aus. Einige der Verfahren nutzen die auch aus der Zellkultur bekannten Mikrotiterplatten. Die Wirkstoffkandidaten werden als Pulver, organische Lösung oder Dispersion in die einzelnen

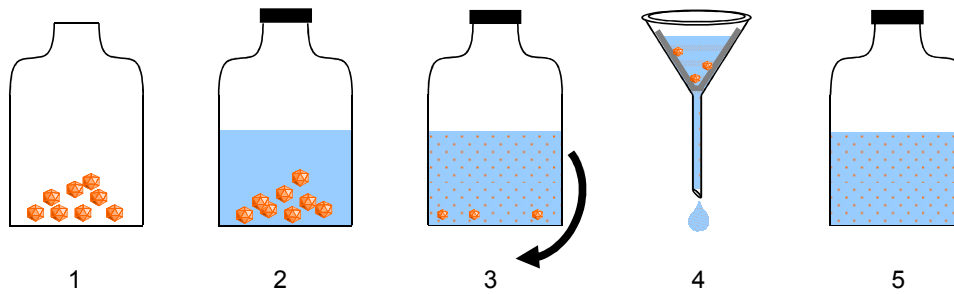
Wells dispensiert; Lösungsmittel werden gegebenenfalls verdampft. Anschließend werden die zu testenden Hilfsstoffe oder Formulierungen zugefügt, die Platten inkubiert und nach entsprechender Zeit ungelöste Substanz abfiltriert bevor die Auswertung erfolgt. Die benötigten Substanzmengen pro Well können bei lediglich 50 µg für den Wirkstoffkandidaten beziehungsweise 10-100 µl für die Formulierungen liegen [152]. Bei der Suche nach einer parenteralen Zubereitung für Paclitaxel ohne Cremophor® EL wurden mit Hilfe eines solchen Screening-Verfahrens 10000 Hilfsstoffkombinationen getestet werden und eine alternative Formulierung gefunden [153]. Zu den Hilfsstoffen, die einschließlich ihrer Lösungen und Kombinationen getestet wurden, zählten Ethanol, Tenside, Polyethylenglycole, ein Gallensalz und ein Cyclodextrin. Lipidbasierte nanopartikuläre Trägersysteme wurden nicht mit einbezogen. Auch in einem ähnlichen Verfahren wurden lediglich Tenside und Bulklipide getestet [154]. In einem halbautomatischen Verfahren mit mittlerem Durchsatz (PASS) wurden neben Tensiden, fetten Ölen und künstlichen Körperflüssigkeiten auch als lipidbasierte kolloidale Dispersionen Mischmizellen und eine parenterale Fettemulsion getestet [155].

### **2.5.2 Verfahren für den Labormaßstab zur Testung kolloidaler Trägersysteme**

Das Einbeziehen (lipidbasierter) kolloidaler Trägersysteme schon in der präklinischen Entwicklungsphase ist durchaus sinnvoll. Mit Co-Solventien oder Tensiden lässt sich zunächst die Löslichkeit häufig recht einfach und schnell verbessern. Gegebenenfalls sind die entsprechenden Formulierungen jedoch für toxikologische oder klinische Studien nicht akzeptabel. Ein möglicher Grund dafür ist Toxizität und ein weiterer, im Gegensatz zu lipidbasierten Trägersystemen, die Gefahr der sofortigen Wirkstoffpräzipitation bei Verdünnung im Blut oder in Gastrointestinalflüssigkeiten [2]. In diesen Fällen müsste der Wirkstoff reformuliert werden, was eine erneute Investition von Zeit und Geld bedeutet.

Auch wenn nicht im industriellen Maßstab geforscht wird, besteht die Herausforderung darin, mit geringen Mengen neuer pharmazeutischer Substanzen zu arbeiten. Karin Rosenblatt stellte einen Ansatz vor, bei dem vorgefertigte nanopartikuläre Trägersysteme auf ihre Eignung für schwer wasserlösliche Wirkstoffe geprüft werden [10]. Das Vorgehen ähnelt im Prinzip den unter 2.3.2 beschriebenen ersten Versuchen zum Wirkstoffeintrag in Lipidnanoemulsionen. Auf die Verwendung organischer Lösungsmittel wird allerdings verzichtet. Ein Überschuss der schwer wasserlöslichen Substanz wird mit dem vorgefertigten kolloidalen Trägersystem versetzt und gerührt oder geschüttelt. Im Anschluss an diese Inkubation wird der nicht solubilisierte Rest des Wirkstoffs abfiltriert. Das Filtrat besteht somit aus der beladenen Nanodispersion, in der der Wirkstoffgehalt bestimmt werden kann (Abbildung 2-1). Für eine Probe werden etwa 2 ml des Trägersystems und wenige Milligramm des Wirkstoffs benötigt. Feste Lipidnanopartikel und Nanoemulsionen konnten





**Abbildung 2-1:** Schematische Darstellung der passiven Beladung. 1: Vorlegen des Wirkstoffs; 2: Zugabe des Trägersystems; 3: Inkubation; 4: Filtration; 5: beladenes Trägersystem. Modifiziert nach K. Rosenblatt.

mit diesem Verfahren unter anderem mit Ibuprofen, Flufenaminsäure und Betamethasonvalerat beladen werden. Eine andere Arbeitsgruppe konnte auf die gleiche Weise Sexualhormone, Glucocorticoide, Diazepam und Carbamazepin in lecithinstabilisierte Sojaölemulsionen und einfache Lecithindispersionen einbringen [156]. Ebenfalls auf der Verwendung von Phospholipiden basiert die sogenannte „Supra Vail®-Instant-Solubilization-Methode“ [157]. Durch Mischen zweier flüssiger Komponenten wird eine transparente, liposomale Zubereitung schwer wasserlöslicher Wirkstoffe erzeugt. Eine Komponente ist eine vorgefertigte liposomale Dispersion. Bei der zweiten handelt es sich um eine wässrige Lösung des betreffenden Wirkstoffs, die organische Lösungsmittel wie Ethanol, Macrogol 300, Propylenglycol, DMSO oder N-Methylpyrrolidon sowie negativ geladene Phospholipide enthält. Die Autoren präsentieren das Verfahren für Diazepam und Ciclosporin A und stellen besonders seine Eignung für die präklinische Entwicklungsphase heraus.

## 2.6 Die antileishmanielle Substanz KuRei300

Viszerale Leishmaniose ist eine Infektion, die durch den Parasiten *Leishmania donovani* hervorgerufen wird. Diese Protozoen schmarotzen in humanen Makrophagen und rufen schwerwiegende Symptome wie Hepatosplenomegalie, Immunsuppression, Hypergammaglobulinämie, Anämie, Gewichtsverlust und Fieber hervor. Wenn viszerale Leishmaniose nicht adäquat behandelt wird, führt sie zum Tod [158]. Trotz der hohen Inzidenz von jährlich etwa 500.000 neuen Fällen [159] sind die gegenwärtigen Therapieoptionen auf Grund zahlreicher Nachteile nicht zufriedenstellend. Zu diesen Nachteilen zählen schwere unerwünschte Wirkungen, Reproduktionstoxizität, Resistenzen, die Notwendigkeit der intravenösen Applikation sowie hohe Kosten. Daher hat die Weltgesundheitsorganisation (WHO) Leishmaniose zu einer vernachlässigten Tropenkrankheit erklärt und zu verstärkter Forschung nach neuen Wirkstoffen aufgerufen [160].

Bei einem Screening-Projekt von Reichwald et al. stellte sich heraus, dass die Substanzklasse der Paullone antileishmanielle Aktivität zeigt [161]. Mit dem Ziel, die pharmakologische Potenz dieser Verbindungen zu erhöhen und gleichzeitig ihre Toxizität zu reduzieren, wurden Chimären aus Paullonen und Chalkonen synthetisiert. Die entstandenen Derivate wurden auf ihre Aktivität gegen *L. Donovanii* an axenischen<sup>2</sup> Amastigoten sowie humanen Makrophagen (Zelllinie THP-1, human acute monocytic leukemia cell line) getestet [161]. Die Verbindung KuRei300 wurde als vielversprechendster Kandidat identifiziert und damit *In-vivo*-Studien an infizierten Mäusen durchgeführt. Die intraperitoneale Applikation der Substanz erwies sich als hoch wirksam gegen viszerale Leishmaniose, da die Parasitenlast in der Leber um bis zu 91% reduziert wurde [162].

Konkrete Aussagen über toxische oder wirksame Konzentrationen von KuRei300 waren allerdings nicht möglich. Die äußerst schlechte Wasserlöslichkeit der Substanz führte zur Präzipitation im Applikationsvehikel und in den Tieren. Aus dieser Problematik resultierte die in dieser Arbeit behandelte Aufgabenstellung, eine geeignete Formulierung für KuRei300 zu finden.

---

<sup>2</sup> Axenisch bedeutet, dass die eigentlich intrazellulär lebenden Amastigoten ohne Wirtszelle kultiviert wurden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Lipophile Matrices

**Cholesterylmyristat** (TCI, Zwijndrecht, Belgien) ist der Ester von Myristinsäure mit Cholesterol. Die Substanz kann thermotrope Mesophasen ausbilden. Bei etwa 72°C schmilzt das Bulkmaterial unter Bildung der flüssigkristallinen smektischen Phase, die bei 79°C in die cholesterische Phase übergeht. Ab etwa 84°C existiert eine isotrope Schmelze [45]. Nanopartikel, die in der Hitze hergestellt werden, können bei 23°C für viele Monate in einem unterkühlt-smektischen Zustand vorliegen [45].

**Lipofundin® MCT 20%** (B. Braun, Melsungen, Deutschland) ist kein Matrixlipid, sondern eine bereits gebrauchsfertige kolloidale Fettemulsion, die für die parenterale Ernährung eingesetzt wird. Die Gesamtzubereitung enthält 10 % Sojabohnenöl, 10 % mittelkettige Triglyceride, 1,2 % Eilecithin und eine vom Hersteller nicht näher spezifizierte Menge Natriumoleat.

**Mittelkettige Triglyceride** (MCT, Miglyol®812, Caelo, Hilden, Deutschland) sind ein flüssiges Gemisch aus Triglyceriden gesättigter Fettsäuren, hauptsächlich der Capryl- und Caprinsäure (8:0, 10:0) [163]. Sie werden vielfältig pharmazeutisch eingesetzt und sind unter anderem in parenteralen Fettemulsionen zu finden.

**Monoolein** (Rylo® MG19, Danisco, Grindsted, Dänemark) ist ein Monoester des Glycerols an Position 1 mit Ölsäure. Die Substanz schmilzt bei 35°C.

**Phosphatidylcholin** (Lecithin) ist ein Phospholipid, bei dem Glycerol zweifach mit Fettsäuren wie Öl-, Stearin- und Palmitinsäure verestert ist. Die dritte Position trägt eine Phosphatgruppe, die ihrerseits mit einem Molekül Cholin verestert ist. In dieser Arbeit wurde Lipoid® S100 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland; Charge 790638-01/909) verwendet, ein hochreines, ungesättigtes Sojalecithin, das zu 94% aus Phosphatidylcholin besteht und eine Phasenübergangstemperatur von -20°C hat (Herstellerangabe). Es handelt sich um hellgelbe, klebrige Flocken mit leicht fischigem Geruch. Lecithin dient beispielsweise als Stabilisator für kolloidale Fettemulsionen oder Membranbestandteil von Liposomen [48]. Lipoid® S100 ist für die parenterale Applikation zugelassen.

**Raffiniertes Rizinusöl** Ph. Eur. 6.0 (Caelo, Hilden, Deutschland) ist ein hellgelbes, hochviskoses Öl, das aus den Samen von *Ricinus communis* gewonnen wird. Die veresterten Fettsäuren bestehen zu 85-92% (Herstellerangabe) aus Ricinolsäure

(12-Hydroxy-9-octadecensäure). Die für Fettsäuren ungewöhnliche Hydroxylgruppe macht das Öl verhältnismäßig polar und viskos.

**Raffiniertes Sonnenblumenöl** (Caelo, Hilden, Deutschland) ist ein gelbes Öl, das aus den Samen von *Helianthus annuus* gewonnen wird. Die enthaltenen Fettsäuren bestehen zu 48-74% aus Linolsäure, 14-40% aus Ölsäure, 4-9% aus Palmitinsäure und 1-7% aus Stearinsäure (Herstellerangabe).

**+/- $\alpha$ -Tocopherol** (synthetisch,  $\leq 96\%$ , Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) ist eine Form des Vitamin E und wird unter anderem als Antioxidans und als Matrix für Tocolemulsionen eingesetzt [164].

**Trimyristin** (Dynasan 114, Sasol, Witten, Deutschland) ist ein monoacidisches Triglycerid der Myristinsäure. Das Bulkmaterial ist ein weißes Pulver und hat einen Schmelzpunkt von etwa 55°C (Herstellerangabe).

Lipofundin® MCT 20%, Lipoid S100, Rylo® MG19 und Trimyristin wurden freundlicherweise von den entsprechenden Herstellern kostenlos zur Verfügung gestellt.

### 3.1.2 Tenside

**Poloxamere** sind nichtionische Block-Copolymere vom ABA-Typ, die aus unverzweigten Ketten mit einem hydrophoben Polypropylenoxid- und zwei hydrophilen Polyethylenoxidteilen bestehen. **Poloxamer 188** (Lutrol® F68, BASF, Ludwigshafen, Deutschland) ist ein weißes Granulat und hat einen HLB von >24 sowie ein mittleres Molekulargewicht von 8400 (Herstellerangabe). Es weist eine relativ geringe Toxizität auf [165] und wird unter anderem in parenteralen Zubereitungen verwendet [166]. **Poloxamer 407** (Pluronic® F127, BASF, Ludwigshafen, Deutschland) ist ein weißes Pulver und hat einen HLB von 22 sowie ein mittleres Molekulargewicht von 12600 (Herstellerangabe). Es wird beispielweise Dermatika und Tabletten zugesetzt.

**Natriumglycocholathydrat** (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) ist ein Salz der Gallensäure Glycocholsäure. Gallensäuren besitzen Tensidcharakter und spielen physiologisch eine wichtige Rolle bei der Solubilisierung von schwer wasserlöslichen Produkten der Fettverdauung [98].

**Polysorbate** (Tween® 80, Tween® 20, Caelo, Hilden, Deutschland) sind PEGylierte Sorbitanfettsäureester und werden zum Beispiel in oralen und parenteralen Darreichungsformen eingesetzt [4].

Lutrol® F68 und Pluronic® F127 wurden freundlicherweise vom Hersteller kostenlos zur Verfügung gestellt. Seit 2012 vermarktet die BASF diese und weitere Emulgatoren unter dem Namen Kolliphor®.

**Tabelle 3-1:** Auflistung weiterer pharmazeutischer Hilfsstoffe.

Substanz	Bezugsquelle	Funktion
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatrium-Dihydrat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	Metallionen-Komplexbildner
Glycerin 98%	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Isotonisierungsmittel
L(+)-Ascorbinsäure p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Antioxidans
Natriumazid p.a.	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	Konservierungsmittel
Thiomersal	Caelo, Hilden, Deutschland	Konservierungsmittel

### 3.1.3 Zusätzliche pharmazeutische Hilfsstoffe

**2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin** (2-Hydroxypropyl- $\beta$ -CD; Fluka, Buchs, Schweiz) ist ein Oligosaccharid aus Glucosemolekülen, das wasserlösliche Einschlussverbindungen mit hydrophoben Substanzen bilden kann. Aufgrund dieser Eigenschaft wird es unter anderem in Arzneimitteln eingesetzt [167].

**Weitere verwendete Hilfsstoffe** sind in Tabelle 3-1 aufgeführt.

### 3.1.4 Aktive pharmazeutische Substanzen

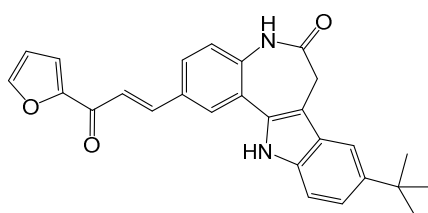
#### 3.1.4.1 KuRei300

Das in dieser Arbeit verwendete KuRei300 wurde am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Universität Braunschweig von Dr. Jasmin Ryczak synthetisiert [161]. Die Qualität des Endproduktes, das aus mehreren Synthesen vereinigt worden war, wurde mittels HPLC und NMR-Spektroskopie von Frau Dr. Ryczak überprüft.

Chemisch handelt es sich bei KuRei300 um eine Chimäre aus einem Kenpaullon und einem Chalkon (Abbildung 3-1) mit einem Molekulargewicht von 424 g/mol. Das kristalline Pulver besitzt eine kräftige orange Farbe und färbt auch Lösungen je nach Konzentration gelb bis orange. Über die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Substanz lagen kaum experimentelle Angaben vor.

#### 3.1.4.2 Weitere Wirkstoffe

Die folgenden Substanzen sind kommerziell erhältlich und werden, bis auf das



**Abbildung 3-1:** Chemische Strukturformel von (E)-KuRei300.

Porphyrinderivat, bereits pharmazeutisch genutzt oder klinisch getestet. Ihre physikochemischen Eigenschaften sind in Tabelle 3-2 zusammengestellt, die Strukturformeln lassen sich Abbildung 3-2 entnehmen.

**Amphotericin B** (AMPHO; AppliChem, Darmstadt, Deutschland) ist ein Makrolid-Polyen-Antibiotikum, das aus Kulturen von *Streptomyces nodosus* gewonnen wird. Die Substanz ist oxidations- und besonders in verdünnter Lösung lichtempfindlich [168]. Unter anderem als liposomale Zubereitung AmBisome® wird Amphotericin B parenteral zur Therapie schwerer (systemischer) Mykosen und zur Sekundärtherapie bei viszeraler Leishmaniose eingesetzt. Bei Hefemykosen im Mund- und Rachenraum oder im Darm stehen mehrere orale Darreichungsformen zur Verfügung (z.B. AmphoMoronal®) [4].

**Betametason-17-valerat** (BTMV, Caelo, Hilden, Deutschland) ist ein Glucocorticoid und wurde in dieser Arbeit lediglich in der Entwicklungsphase der Wirkstoffbeschichtungen verwendet.

**Curcumin** (CURC; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) ist ein intensiv gelbes Polyphenol und Hauptbestandteil des Wurzelstocks von *Curcuma longa* (Gelbwurz). Es zeigt unter anderem antiinflammatorische und antiproliferative Effekte und wird bereits in

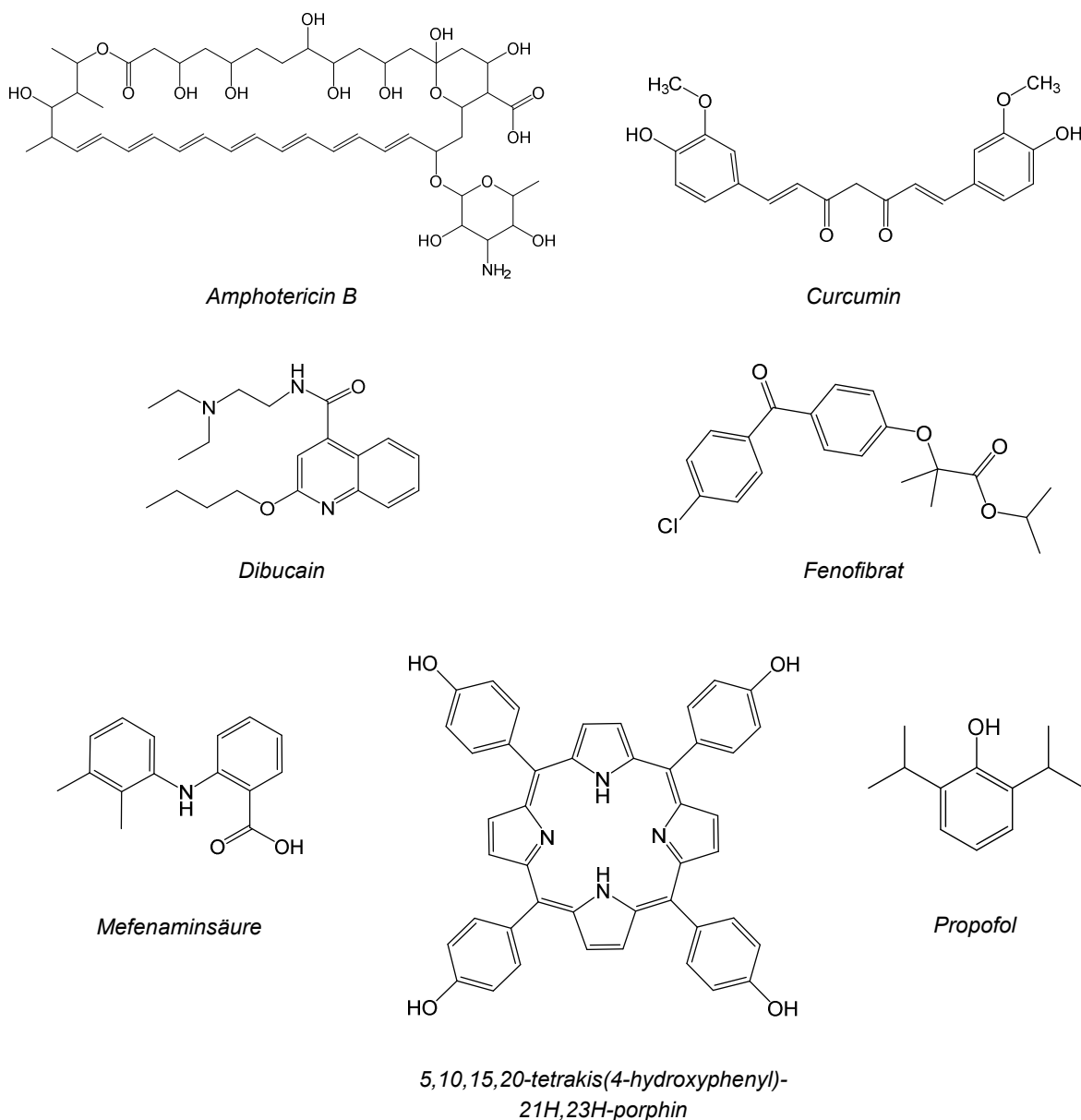
**Tabelle 3-2:** Physikochemische Eigenschaften der untersuchten Wirkstoffe (WS).

WS	MW [g/mol]	T <sub>s</sub> [°C]	pK <sub>a</sub>	logP	Intrinsische Wasserlöslichkeit L [µg/ml] [µM]
AMPHO	924	Zersetzung > 170	3,72 ± 0,70 8,12 ± 0,70	2,30 ± 0,89	praktisch unlöslich bei pH 6-7 <sup>a</sup>
CURC	368	183	8,11 ± 0,46	3,07 ± 0,44	44 120
DIBU	343	64	12,90 ± 0,46 9,07 ± 0,10	4,76 ± 0,56	14 <sup>b</sup> 40,8
FENO	361	79-81 <sup>c</sup>	-	5,80 ± 0,39	1,1 3,0
MEF	241	231	3,73 ± 0,36	4,84 ± 0,43	0,0442 <sup>d</sup> 0,2
PORPH	679	lt. Hersteller < 300	k.l.	8,39 ± 1,98	k.l.
PROP	178	19	11,00 ± 0,10	3,66 ± 0,25	290 1600

Soweit nicht anders angegeben wurden die Daten der Datenbank SciFinder entnommen; Berechnungen erfolgten mit der Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2013 ACD/Labs). Intrinsische Löslichkeit, pK<sub>a</sub> und logP wurden für 25°C berechnet.

<sup>a</sup> [168], <sup>b</sup> [169], <sup>c</sup> [170], <sup>d</sup> [171]

k.l.: keine Information



**Abbildung 3-2:** Chemische Strukturformeln der verwendeten Wirkstoffe.

klinischen Studien getestet [172]. **Dibucain** (DIBU, Cinchocain; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) ist ein Lokalanästhetikum vom Amid-Typ. Als Salbe oder Zäpfchen ist es zur Schmerzlinderung beim anorektalen Symptomenkomplex indiziert (z.B. DoloPosterine®) [4].

**Fenofibrat** (FENO; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) ist ein Fibrinsäurederivat und wird zur Senkung der Blutfettwerte bei Hypertriglyceridämie und gemischter Hyperlipidämie eingesetzt. Der Wirkstoff ist in nanokristalliner Form beispielsweise in Filmtabletten des Präparats Lipidil 145 One® enthalten [4].

**Mefenaminsäure** (MEF; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) ist ein nichtsteroidales Antirheumatikum und momentan in Deutschland nicht zugelassen. In der Schweiz sind

Filtabletten, Kapseln und Zäpfchen zur Behandlung von Schmerzen, Fieber und Entzündungen im Handel (z.B. Ponstan®) [173].

**5,10,15,20-tetrakis(4-hydroxyphenyl)-21H,23H-porphin** (Porphyrin, PORPH; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) ist ein intensiv blau-violettes Porphyrinderivat und wird in dieser Form nicht pharmazeutisch genutzt. Es ist dem Wirkstoff Temoporfin allerdings chemisch sehr ähnlich und unterscheidet sich lediglich in der Position der Hydroxylgruppen. Temoporfin ist zur palliativen Behandlung des Plattenepithelkarzinoms im Kopf- und Halsbereich zugelassen (z.B. Foscan® Injektionslösung) [4].

**Propofol** (PROP; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) ist ein Phenolderivat und wird als Narkotikum zur Einleitung und Aufrechterhaltung von Narkosen sowie zur Sedierung von Patienten eingesetzt. Es ist ein Beispiel für die Formulierung von schwer wasserlöslichen Wirkstoffen mit Hilfe kolloidaler Fetteulsionen (z.B. Disoprivan®) [4].

### 3.1.5 Wasser, Lösungsmittel, Chemikalien

**Wasser** für die Herstellung der Dispersionen und die chromatographischen Untersuchungen wurde durch Aufbereitung inklusive Filtration (Porengröße 0,2 µm) von demineralisiertem Wasser gewonnen (EASY pure LF, Barnstead, USA). Eine Ausnahme bildet die Dispersion kubischer Nanopartikel, die mit bidestilliertem Wasser hergestellt wurde. Für die Verdünnung der Proben bei den PCS-Messungen wurde demineralisiertes Wasser verwendet.

**Sonstige Lösungsmittel und Chemikalien** sind in Tabelle 3-3 zusammengestellt.

**Tabelle 3-3:** Auflistung der verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien.

Substanz	Hersteller	Reinheit
Aceton	diverse	HPLC-Qualität
Acetonitril (ACN)	diverse	HPLC-Qualität
Chloroform	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland	HPLC-Qualität
Diethylether	VWR, Darmstadt, Deutschland	HPLC-Qualität
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	HPLC-Qualität
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland	pro analysi
DMSO-d6 (99,96%+0,03% Tetramethylsilan)	Deutero GmbH, Kastellaun, Deutschland	-
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland	HPLC-Qualität
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	HPLC-Qualität
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland	pro analysi
Methanol	diverse	HPLC-Qualität
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland	pro analysi
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	-
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland	pro analysi
Tetrahydrofuran (THF)	diverse	HPLC-Qualität



### 3.1.6 Filter

Die Filter wurden hauptsächlich für die passive Beladung genutzt, aber auch beim Abtrennen mikropartikulärer Bestandteile nach der Prämix-Membranextrusion. In Tabelle 3-4 sind die Filter mit ihren wichtigsten Eigenschaften aufgeführt. Jedem Filter wurde eine Abkürzung zugewiesen, die im Folgenden verwendet wird.

**Tabelle 3-4:** Übersicht über die verwendeten Filter und ihre wichtigsten Eigenschaften.

Abkürzung	Filtertyp; Durchmesser	Art der Anwendung	Ausschluss- grenze	Filtermaterial	Name; Hersteller
MF 0,22	Membranfilter; ø 33 mm	Spritzenvorsatzfilter	0,22 µm	PES <sup>a</sup>	Rotilabo <sup>®</sup> ; Roth, Karlsruhe, Deutschland
MF 0,45	Membranfilter; ø 33 mm	Spritzenvorsatzfilter	0,45 µm	PVDF <sup>b</sup>	Rotilabo <sup>®</sup> ; Roth, Karlsruhe, Deutschland
GF 0,4	Gewebefilter; ø 25 mm	Scheibe zum Einlegen in Filtrationsvorrichtung	0,4 µm	Glasfaser, bindemittelfrei	MN85/220BF; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
GF 0,7	Gewebefilter; ø 25 mm	Scheibe zum Einlegen in Filtrationsvorrichtung	0,7 µm	Glasfaser	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
GF 2,7	Gewebefilter; ø 25 mm	Scheibe zum Einlegen in Filtrationsvorrichtung	2,7 µm	Glasfaser	Whatman, Buckinghamshire, Großbritannien
P 4-12	Papierfilter	im Trichter	4-12 µm	Papier	MN615; Macherey- Nagel, Düren, Deutschland
LF	Membranfilter; ø 50 mm	Spritzenvorsatzfilter	0,2 µm	PTFE <sup>c</sup>	Millex-FG Vent; Millipore, Millierica, USA
HMF	Membranfilter; ø 33 mm	Spritzenvorsatzfilter	0,2 µm	hydrophobes PVDF <sup>b</sup>	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland
EFG	Membranfilter; ø 47 mm	Scheibe zum Einlegen in Extrusionsvorrichtung	0,1 µm 0,2 µm 0,4 µm	Polycarbonat	Nuclepore <sup>®</sup> ; Whatman, Buckinghamshire, Großbritannien
EFK	Membranfilter; ø 19 mm	Scheibe zum Einlegen in Extrusionsvorrichtung	0,1 µm	Polycarbonat	Avestin, Ottawa, Kanada

<sup>a</sup>Polyethersulfon, <sup>b</sup>Polyvinylidenfluorid, <sup>c</sup>Polytetrafluorethylen

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Herstellung der für KuRei300 getesteten Trägersysteme**

#### **3.2.1.1 Lipidfreie Trägersysteme**

Eine 2-HP- $\beta$ -CD-Lösung (10 mM) wurde hergestellt, indem das Cyclodextrin in der wässrigen Phase gelöst wurde. Diese enthielt 2,25% Glycerol und 0,05% Natriumazid.

#### **3.2.1.2 Lipidbasierte kolloidale Trägersysteme**

Im Folgenden wird die Herstellung der Dispersionen einzeln beschrieben. Zusätzlich gibt Tabelle 3-5 eine Übersicht über die Zusammensetzungen aller Systeme einschließlich des Fertigpräparats Lipofundin<sup>®</sup> MCT 20%. Nach der Herstellung wurden die Systeme bei 20°C gelagert.

##### **Mischmizellen**

Die Zusammensetzung des in dieser Arbeit verwendeten Mischmizellsystems lehnt sich an das inzwischen in Deutschland nicht mehr vermarktete Präparat Valium<sup>®</sup> MM an. Dessen Zusammensetzung wurde der Dissertation von K. Westesen entnommen [174]. Die wässrige Phase enthielt 2,25% Glycerol, 0,05% Natriumazid und 10 mM Phosphatpuffer. Die Lösung wurde auf pH 7,4 eingestellt, um die Hydrolyse der Phospholipide zu reduzieren. Das Natriumglycocholathydrat wurde in der wässrigen Phase gelöst und nach Zugabe der Phospholipide wurde der Ansatz solange gerührt, bis diese homogen dispergiert waren. Die Mischung wurde dann kräftig drei Tage lang bei 750 rpm geschüttelt (ms 3 digital IKA, Staufen, Deutschland) und wandelte sich dabei von einer trüben Dispersion in eine durchscheinende, mischmizellare Lösung um.

##### **Liposomen**

Die Zusammensetzung der Dispersion wurde der Dissertation von K. Westesen entlehnt [174]. In der wässrigen Phase, die der der Mischmizellen entsprach, wurden die Phospholipide suspendiert und unter Rühren (RO 10 IKA, Staufen, Germany) über Nacht quellen gelassen. Anschließend wurde die Suspension entweder manuell (Avestin Liposofast, Ottawa, Kanada) oder mit einem motorbetriebenen Extruder (Avestin EmulsiFlex C5, Ottawa, Kanada) 11 oder 21 Zyklen extrudiert. Die Membranen besaßen eine Porengröße von 100 nm (EFG für EmulsiFlex, EFK für Liposofast). Durch diese Art der Herstellung wurden kleine unilamellare Liposomen (SUV) erzeugt [93].

##### **Unterkühlt-smektische Lipidnanopartikel**

Die wässrige Phase enthielt 2,05 % Poloxamer 188, 2,5% Glycerol sowie 0,01% Thiomersal. Das Cholesterylmyristat und die wässrige Phase wurden separat auf 95°C erhitzt und vereinigt und zwei Minuten lang bei 22.000 rpm (T25 digital Ultra Turrax, IKA, Staufen,

Deutschland) dispergiert. Diese Vordispersion (40 ml) wurde für fünf Minuten bei 930 bar und 95°C hochdruckschmelzemulgiert (Microfluidizer M110-PS, Interaktionskammer Typ F12Y DIXC, Microfluidics, Newton, USA). An dieser Stelle nochmals herzlichen Dank an Friederike Mengersen, die die eigentliche Herstellung durchführte.

### Kubische Lipidnanopartikel

Die Zubereitung enthielt 0,6% Poloxamer 407 und 4,4% Monoolein in einer wässrigen Phase aus reinem, bidestilliertem Wasser. Monoolein und Poloxamer 407 wurden gemeinsam auf 60°C erhitzt und die geschmolzene Mischung dann rasch tropfenweise unter Rühren dem raumtemperierten Wasser zugefügt. Die Dispersion wurde über Nacht äquilibrieren gelassen und dann bei etwa 50°C und 400 bar für fünf Zyklen homogenisiert (APV Gaulin Micron Lab 40, APV Homogeniser GmbH, Lübeck, Deutschland). Abschließend wurde die Dispersion bei 121°C und 2 bar für 15 min autoklaviert, um vesikuläre Strukturen in kubische Nanopartikel vom P-Typ zu überführen [112].

#### 3.2.1.3 Herstellung der mischmizellaren Formulierung für die *In-vivo*-Studien

Die mischmizellare Formulierung war prinzipiell zusammengesetzt wie in Tabelle 3-5 angegeben und wurde hergestellt wie unter 3.2.1.2 beschrieben. Abweichend davon enthielt die Zubereitung zusätzlich 0,1 % EDTA in der wässrigen Phase sowie 0,005 % Thiomersal an Stelle von Natriumazid. KuRei300 wurde aus einer Beschichtung (Ethanol/ 26,7 mbar) durch passive Beladung eingebracht (siehe 3.2.4 und 3.2.5). Dabei wurde auf die Ergebnisse der vorangegangenen Beladungsstudie zurückgegriffen und nur soviel Wirkstoff vorgelegt, wie sich in der Zubereitung löst. Die beladene Zubereitung aus den einzelnen Injektionsgefäßen wurde unter einer Reinraumwerkbank mit laminarem Luftstrom (laminar air flow, LAF) gepoolt, sterilfiltriert (GF 0,22) und zu 2,1 ml in Injektionsgefäße (2 ml) aliquotiert. Der anschließend durchgeführte Bubble-Point-Test entsprach den Anforderungen [175]. Vor dem

**Tabelle 3-5:** Zusammensetzung der für die Beladung mit KuRei300 verwendeten lipidbasierten kolloidalen Trägersysteme. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtdispersionen (w/w).

Trägersystem	Lipid [%]	Tensid [%]
Liposomen	Lipoid® S100 [15 %]	-
Mischmizellen	Lipoid® S100 [13,4 %]	Natriumglycocholat- Hydrat [7,4 %]
unterkühlt-smektische Nanopartikel <sup>a</sup>	Cholesterylmyristat [2,5 %]	Poloxamer 188 [2 %]
kubische Nanopartikel	Monoolein [4,4 %]	Poloxamer 407 [0,6 %]
Lipofundin® MCT 20 %	Sojabohnenöl [10 %] MCT [10 %]	Eilecithin [1,2 %] Natriumoleat [nicht spezifiziert]

<sup>a</sup>Zusammensetzung könnte durch Homogenisationsprozess geringfügig verändert worden sein.

Verbördeln, das ebenfalls unter LAF geschah, wurde der Kopfraum der Gefäße mit sterilfiltriertem Stickstoff gespült (Reinheit des Stickstoffs: 5.0; Filter LF). Die Injektionsgefäße waren zuvor heißluftsterilisiert (Trockenschrank, 160°C, 2 h), die Stopfen und der Stickstofffilter autoklaviert (121°C, 2 bar, 15 Minuten) worden. Der Gehalt von KuRei300 wurde mittels HPLC bestimmt.

### **3.2.2 Herstellung der Dispersionen für die Untersuchung zur Wirkstofflokalisierung**

Die Wirkstofflokalisierung wurde für Lipidnanoemulsionen und –suspensionen untersucht. Beide Dispersionssysteme enthielten Trimyristin, Poloxamer 188 und Wasser, das mit 0,005 % Thiomersal konserviert war. Vor der Beladung wurden alle Dispersionen auf etwa 1,6 % freies Poloxamer und etwa 1 % Trimyristin eingestellt. Alle Beladungsexperimente wurden mit einer einzigen Charge der jeweiligen Trimyristindispersion durchgeführt.

#### **3.2.2.1 Herstellung der Nanoemulsionen**

##### **Prämix-Membranemulgierung**

Das Verfahren wurde nach Joseph et al. modifiziert [61] und für die Herstellung von Emulsionen mit mittleren Partikelgrößen um 100, 200 und 400 nm eingesetzt. Die Rezepturen enthielten 5 % Poloxamer 188 (w/w) und 5 % Trimyristin (w/w). Zunächst wurden alle Geräte sowie, jeweils separat, die emulgatorhaltige wässrige Phase und das Trimyristin auf 65°C erhitzt. Die wässrige Phase wurde der Trimyristinschmelze zugefügt und beides anschließend für 3 min bei 16.000 rpm vordispersiert (T25 digital Ultra Turrax, IKA, Staufen, Deutschland). Dieser Prämix (Voremulsion) wurde dann mit Hilfe eines motorenbetriebenen Extruders (Avestin EmulsiFlex C5, Ottawa, Kanada) für 40 Zyklen durch Filtermembranen (EF) von 100, 200 oder 400 nm Porengröße extrudiert. Dabei resultierte ein Vordruck an der Extrudiereinheit von 5-7 bar. Da die Emulsionen mikropartikuläres Material enthielten, wurden sie nach Abkühlen auf Raumtemperatur filtriert (P 4-12 und/oder GF 1,2/ GF 2,7). Die erhaltenen Nanoemulsionen wurden bei 20°C gelagert.

##### **Mikrofluidische Hochdruckschmelzhomogenisation**

Für die Herstellung einer Emulsion mit mittleren Partikelgrößen von 50 nm wurde ein mikrofluidischer Homogenisator (Microfluidizer M110-PS, Interaktionskammer Typ F12Y DIXC, Microfluidics, Newton, USA) verwendet. Die Rezeptur enthielt 12 % Poloxamer 188 (w/w) und 10 % Trimyristin (w/w). Zunächst wurden alle Geräte sowie, jeweils separat, die emulgatorhaltige wässrige Phase und das Trimyristin auf 75°C erhitzt. Die Trimyristinschmelze und die wässrige Phase wurden anschließend für 3 min bei 16.000 rpm vordispersiert (T25 digital Ultra Turrax, IKA, Staufen, Deutschland). Dieser Prämix (Voremulsion) wurde dann für 30 Zyklen bei 1800 bar hochdruckhomogenisiert. Im

Gegensatz zur Herstellung mit Prämix-Membranemulgierung waren in der Emulsion keine Mikropartikel sichtbar. Die erhaltenen Nanoemulsionen wurden bei 20°C gelagert.

### **3.2.2.2 Erzeugung der Nanosuspensionen**

Die korrespondierenden Suspensionen wurden aus einem Teil der dialysierten (siehe 3.2.2.3) Emulsionen durch Lagerung im Kühlschrank (4-8°C) erzeugt. Vor dem Kristallisationsprozess wurden die Emulsionvolumina, die für die Umwandlung in Nanosuspensionen vorgesehen waren, durch Zugabe von 15-prozentiger Poloxamerlösung auf 4 % freies Poloxamer eingestellt. Dieser hohe Emulgatoranteil sollte physikalischen Instabilitäten vorbeugen, die durch die Erzeugung neuer Grenzflächen im Zuge der Tröpfchenkristallisation auftreten. Die fertigen Nanosuspensionen wurden bei 20°C gelagert.

### **3.2.2.3 Einstellung des Poloxamergehalts durch Dialyse**

Um einen Einfluss von freiem, nicht partikelgebundenem Poloxamer auszuschließen oder zumindest in vergleichbarem Ausmaß zu gestalten, wurde dessen Konzentration mittels Dialyse auf 1,6 % eingestellt. Dazu wurden die Dispersionen in einen Dialyseschlauch (MWCO 100 kDa Celluloseester, Spectra/Por Biotech, SpectrumEurope, Breda, Niederlande) in eine 1,6-prozentige Lösung von Poloxamer 188 eingebracht [85] und der Ansatz mit einem Magnetrührkern leicht bewegt. Der Poloxamergehalt im Dialysemedium wurde durch Messung des Brechungsindex überprüft (Refraktometer: Abbemat-WR, Anton Paar, Ostfildern-Scharnhausen, Deutschland) und entsprechend durch Wasser- oder Poloxamerzugabe korrigiert. Die Kalibrierung des Refraktometers erfolgte mit Poloxamerlösungen bekannter Konzentration. Nach maximal 48 Stunden war eine konstante Poloxamerkonzentration erreicht, was als Ende des Dialyseprozesses gewertet wurde. Das Volumenverhältnis zwischen Dispersion und Dialysemedium betrug 1:40 für die Nanoemulsionen und 1:80 für die –suspensionen. Die Dialyse wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

### **3.2.2.4 Einstellung der Trimyristinkonzentration**

Der Einfluss des Massenanteils der dispersen Phase bei den Beladungsexperimenten, beispielsweise auf die Beladungsgeschwindigkeit, sollte so gering wie möglich gehalten werden. Deshalb wurden die Dispersionen vor der Beladung alle auf den gleichen Trimyristingehalt eingestellt. Da die Trimyristinquantifizierung mittels HPLC sehr aufwendig ist, wurde die DSC als pragmatische Alternative genutzt. Es wurde der normierte Wärmefluss für die Kristallisation des Trimyristins in den Dispersionen bestimmt und durch entsprechende Verdünnung mit einer 1,6-prozentigen Poloxamerlösung auf 1,5 J/g eingestellt. Mit Bezug auf den Wert für das Bulkmaterial des Trimyristins entsprach das einem Lipidgehalt von etwa 1,5 % in den Dispersionen. Nach dem auf die Inkubation folgenden Filtrationsschritt (3.2.4)

wurde der Trimyristingehalt in den beladenen Dispersionen mittels HPLC erneut bestimmt (3.2.8.1).

### **3.2.2.5 Nomenklatur**

Im Folgenden werden die Dispersionen mit „E“ für Emulsion oder „S“ für Suspension sowie ihrer ungefähren z-Average-Partikelgröße aus der PCS-Messung gekennzeichnet. Beispielsweise bezeichnet „E50“ eine Nanoemulsion mit einem z-Average-Partikeldurchmesser von etwa 50 nm.

### **3.2.3 Löslichkeitsversuche mit KuRei300**

Vor der Testung möglicher Trägersysteme und der Erzeugung von Beschichtungen aus KuRei300 wurden Versuche zur Löslichkeit durchgeführt.

#### **Organische Lösungsmittel**

Wenige Krümel der Substanz wurden auf einen Objektträger gestreut und tropfenweise mit jeweils ACN, Aceton, DMSO, Ethanol, Isopropanol, Methanol oder THF versetzt. Geschwindigkeit und Ausmaß der Auflösung wurden vergleichend eingeordnet. Für DMSO, Ethanol und THF wurden daraufhin mit definierten Substanzmassen und Lösungsmittelvolumina die erzielbaren Konzentrationen näher eingegrenzt. Exakte Löslichkeiten wurden nicht bestimmt.

#### **Wasser und wässrige Tensidlösungen**

In Injektionsgefäße (2 ml) wurden etwa 2 ml Wasser oder wässrige Lösungen von Polysorbat 20 (5% w/w), Polysorbat 80 (5% w/w), Tyloxapol (5% w/w) oder Poloxamer 188 (2% w/w) vorgelegt und wenige Krümel KuRei300 zugegeben. Die Proben wurden mit einem Magnetrührkern versehen und für 24 h bei Raumtemperatur mit etwa 300 rpm gerührt. Anschließend wurde überschüssiges KuRei300 abfiltriert (MF 0,22). Die Auswertung erfolgte für Wasser und die Poloxamerlösung mittels HPLC, für die übrigen Lösungen optisch über den Farbeindruck. Für jede Lösung und das Wasser wurden jeweils zwei Injektionsgefäße angesetzt.

#### **Fette Öle und $\alpha$ -Tocopherol**

In Injektionsgefäße (2 ml) wurden etwa 2 ml MCT, Sonnenblumenöl, Rizinusöl oder  $\alpha$ -Tocopherol vorgelegt und wenige Krümel KuRei300 zugegeben. Die Proben wurden mit einem Magnetrührkern versehen und für 24 h bei Raumtemperatur mit etwa 300 rpm gerührt. Auf Grund der zum Teil sehr viskosen Grundlagen wurde auf das anschließende Abfiltrieren von überschüssigem KuRei300 verzichtet und das Lösevermögen optisch über den Farbeindruck vergleichend eingeschätzt. Für jede Grundlage wurde ein Injektionsgefäß angesetzt.

### 3.2.4 Passive Beladung

#### 3.2.4.1 Vorlage der Wirkstoffe

In kleinen Injektionsgefäßen (2 ml, Klarglas Glasart I Europäisches Arzneibuch, Zscheile & Klinger, Hamburg, Deutschland) wurden die Wirkstoffe entweder als Pulver oder Flüssigkeit wie vom Hersteller bezogen oder als Beschichtung vorgelegt.

#### 3.2.4.2 Inkubation

Zu dem vorgelegten Wirkstoff (etwa 0,5 – 5 mg) wurden 1,8-2,0 ml des entsprechenden Trägersystems pipettiert. Nach dem Verbördeln (Stopfen: Chlorbutyl  $\varnothing$  13 mm, Zscheile & Klinger, Hamburg, Deutschland) wurden die Proben auf einem Rotator (Multi RS-60 BioSan, Riga, Lettland) bei 20 rpm unter Lichtschutz bei 20°C bewegt. Wegen seiner chemischen Labilität [168] waren die Gefäße, die AMPHO enthielten, vor dem Verschließen mit Stickstoff gespült worden. Da sich KuRei300 ebenfalls als chemisch labil erwies, wurden diese Proben sofern nicht anders ausgewiesen ebenfalls mit Stickstoff geschützt. Es wurden je zwei Injektionsgefäße pro Versuch angesetzt.

Für die Untersuchungen zur Wirkstofflokalisierung wurden direkt vor der Inkubation die dialysierten und lipidnormierten Trimyristindispersionen nochmal verdünnt. Jeweils 1350  $\mu$ l einer Nanoemulsion oder -suspension wurden in ein Injektionsgefäß pipettiert und 450  $\mu$ l einer 1,6-prozentigen wässrigen Poloxamerlösung zugefügt. Im Fall von MEF und DIBU war diese Lösung gepuffert, um die Dissoziation der Wirkstoffe zu verhindern. Die Puffer wurden für MEF auf einen pH-Wert von 1,6 (KCl/HCl, 300 mM, entsprechend 75 mM Gesamtpufferstärke in der Inkubationsprobe) und für DIBU von 11 (Phosphatpuffer, 100 mM, entsprechend 25 mM Gesamtpufferstärke in der Inkubationsprobe) eingestellt. Um die Löslichkeit der Wirkstoffe in der wässrigen Phase der Trimyristindispersionen zu bestimmen, wurde auch reine 1,6-prozentige Poloxamerlösung (gegebenenfalls gepuffert) mit den Wirkstoffen inkubiert.

#### 3.2.4.3 Filtration

Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden nicht solubilisierter Wirkstoffreste durch Filtration vom getesteten Trägersystem abgetrennt. In Tabelle 3-6 ist aufgeführt, welcher Filtertyp jeweils eingesetzt wurde. Nach Möglichkeit wurden Glasfaserfilter verwendet, weil davon ausgegangen wurde, dass an diesen keine Adsorptionsphänomene in nennenswertem Umfang auftreten. Die Glasfaserfilter wurden in eine Filtrationszelle (Eigenbau des Lehrstuhls für Pharmazeutische Technologie der Universität Jena; Fassungsvermögen etwa 15 ml) eingebracht und anschließend das zu filtrierende Trägersystem eingefüllt; auf die Rührfunktion der Zelle wurde verzichtet. Es bestand die Möglichkeit, die Zelle mit Druckluft

zu beaufschlagen, ein Pipettenhütchen erzeugte jedoch ausreichend Filtrationsdruck (Abbildung 3-3). Für einige Proben, besonders wenn keine Beschichtung hergestellt werden konnte, wurden Spritzenvorsatzfilter verwendet. Bei den Studien zur Wirkstofflokalisierung wurde bei den Beladungsreihen der Emulsionen beziehungsweise Suspensionen auch

**Tabelle 3-6:** Übersicht über Experimentdetails zur Inkubation bezüglich Inkubationsdauer, -volumen, Pufferung und Stickstoffbegasung.

WS	Experiment	Träger	Form	Inkubation	Volumen	Filter	Bemerkung
KuRei	Löslichkeit	Wasser	P	24 h	2 ml	MF 0,22	
		wässr. Tensidlg.	P	24 h	2 ml	MF 0,22	
		fette Öle	P	24 h	2 ml	keiner	
		$\alpha$ -Tocopherol	P	24 h	2 ml	keiner	
	Formulierung	2-HP- $\beta$ -CD	P	24 h	2 ml	MF 0,22	
		kubische NP	B	48 h	2 ml	GF 0,4	N <sub>2</sub>
		Lipofundin	B	48 h	2 ml	GF 0,4	N <sub>2</sub>
		u-sm NP	B	48 h	2 ml	GF 0,4	N <sub>2</sub>
		Liposomen	B, P	48 h	2 ml	MF 0,22	N <sub>2</sub>
		Mischmizellen	B, P	48 h	2 ml	MF 0,22	N <sub>2</sub>
	Geschwindigkeit	Mischmizellen	B, P	12 – 48 h	2 ml	MF 0,22	N <sub>2</sub>
AMPHO	Lokalisation	E50, E100, Pol	P	24 h	1,8 ml	MF 0,22	N <sub>2</sub>
	Lokalisation	S50, S100, Pol	P	24 h	1,8 ml	MF 0,45	N <sub>2</sub>
	Zeitreihe	E50	P	1, 2, 3 d	1,8 ml	MF 0,22	N <sub>2</sub>
CURC	Lokalisation	E50, E100, Pol	P	24 h	1,8 ml	MF 0,22	
	Lokalisation	S50, S100, Pol	P	24 h	1,8 ml	MF 0,45	
	Zeitreihe	E50 <sup>a</sup>	P	1, 2, 3 d	1,8 ml	MF 0,45	
DIBU	Lokalisation	E50, E100, E200, Pol	B	24 h	1,8 ml	GF 0,4	pH 11
	Lokalisation	E400	B	24 h	1,8 ml	GF 0,7	pH 11
	Lokalisation	S50, S100, S200, Pol	B	24 h	1,8 ml	GF 0,4	pH 11
	Zeitreihe	E100	B	1 – 7 d <sup>b</sup>	1,8 ml	GF 0,4	pH 11
	Zeitreihe	E400	B	1 – 7 d <sup>b</sup>	1,8 ml	GF 0,7	pH 11
	Zeitreihe	E100	B	1 – 24 h <sup>c</sup>	1,8 ml	GF 0,4	pH 11
FENO	Lokalisation	E50, E100, E200, Pol	B	24 h	1,8 ml	GF 0,4	
	Lokalisation	E400	B	24 h	1,8 ml	GF 0,7	
	Lokalisation	S50, S100, S200, Pol	B	24 h	1,8 ml	GF 0,4	
	Zeitreihe	E 50 <sup>a</sup>	B	1, 2, 3 d	1,8 ml	MF 0,45	
MEF	Lokalisation	E50, E100, E200, Pol	B	24 h	1,8 ml	GF 0,4	pH 1,6
	Lokalisation	E400	B	24 h	1,8 ml	GF 0,7	pH 1,6
	Lokalisation	S50, S100, S200, Pol	B	24 h	1,8 ml	GF 0,4	pH 1,6
	Zeitreihe	E100	B	1 – 7 d <sup>b</sup>	1,8 ml	GF 0,4	pH 1,6
	Zeitreihe	E400	B	1 – 7 d <sup>b</sup>	1,8 ml	GF 0,7	pH 1,6
	Zeitreihe	E100	B	1 – 24 h <sup>c</sup>	1,8 ml	GF 0,4	pH 1,6
PORPH	Lokalisation	E50, E100, Pol	P	24 h	1,8 ml	MF 0,22	
	Lokalisation	S50, S100, Pol	P	24 h	1,8 ml	MF 0,45	
PROP	Lokalisation	E50, E100, E200, Pol	FI	24 h	1,8 ml	GF 0,4	
	Lokalisation	E400	FI	24 h	1,8 ml	GF 0,7	
	Lokalisation	S50, S100, S200, Pol	FI	24 h	1,8 ml	GF 0,4	

<sup>a</sup>Für die zeitabhängige Beladung der E50 wurde für die Wirkstoffe CURC und FENO durch MF 0,45 filtriert. Grund dafür war, dass zum Zeitpunkt dieser Experimente bereits bekannt war, dass CURC an der zugehörigen Filtermembran weniger adsorbiert als an der des Filters MF 0,22. Für FENO wurde für diese Experimente ebenfalls ein Membranfilter gewählt, weil die Filtration zeitsparender durchführbar ist als bei Verwendung von Glasfaserfiltern.

<sup>b</sup>Inkubationsdauern 1,2,3,4,5,6 und 7 Tage. <sup>c</sup>Inkubationsdauern 1,2,3,4,8,12 und 24 Stunden.

B: Beschichtung; FI: Flüssigkeit; NP: Nanopartikel; P: Pulver; u-sm: unterkühlt-smektisch; WS: Wirkstoff





**Abbildung 3-3:** Filtrationszelle, die beim Einsatz von Glasfaserfiltern benutzt wurde.

jeweils die Löslichkeit des Wirkstoffs in einer 1,6-prozentigen Poloxamerlösung bestimmt. Für diese Proben wurden die gleichen Filter eingesetzt wie für die zugehörigen Dispersionen. Bei Wirkstoffen, bei denen die komplette Emulsionsreihe (E50 bis E400) untersucht wurde, wurde die Poloxamerlösung mit GF 0,4 filtriert. Im Anschluss an die Filtration wurde die Abwesenheit von Wirkstoffkristallen polarisationslichtmikroskopisch verifiziert.

Für die Spritzenvorsatzfilter wurde eine Abschätzung der Wirkstoffadsorption durchgeführt. Dazu wurden Proben einer nach der Inkubation bereits filtrierten Dispersion vor und nach einer weiteren Filterpassage mit einem frischen Filter genommen und zur Bestimmung der UV-Absorption aufbereitet (3.2.8.2). Aus der Differenz beider Absorptionswerte ergab sich die Wiederfindungsrate. Für den MF 0,22 (AMPHO, CURC, PORPH) wurde die Emulsion E100 und für den MF 0,45 (dito) die Suspension S50 verwendet.

#### 3.2.4.4 Ermittlung und Auswertung der Beladung

Im Anschluss an die Filtration wurde der Gehalt des jeweiligen Wirkstoffs mittels UV-Spektrometrie oder HPLC-UV quantifiziert. Für die Trimyristindispersionen wurde zudem in den meisten Fällen der Gehalt des Trimyristins mittels HPLC-UV bestimmt. Lediglich bei den Beladungsexperimenten mit Zeitreihe (Tabelle 3-6) wurde auf eine Lipidbestimmung nach der Filtration verzichtet.

Die Wirkstoffkonzentrationen wurden als Masse pro Volumeneinheit Trägersystem angegeben. Im Fall von Lipidnanodispersionen wurde zusätzlich die prozentuale Wirkstoffbeladung mit Bezug auf die Lipidmasse in der Dispersion berechnet. Sie ist der Quotient aus Wirkstoff- und Lipidkonzentration. Für die KuRei300-Experimente wurde dafür der nominale Lipidgehalt der jeweiligen Rezeptur zu Grunde gelegt. Für die Trimyristindispersionen wurde der vor, oder wenn vorhanden nach, der Filtration bestimmte Lipidgehalt ( $c_L$ ) verwendet. Bei den Untersuchungen zur Wirkstofflokalisation wurde in die Berechnung der prozentualen Beladung ein Korrekturschritt eingefügt (Gleichung 1). Von der Wirkstoffkonzentration in der Dispersion ( $c_D$ ) wurde die Wirkstoffkonzentration in einer

ebenfalls untersuchten 1,6-prozentigen Poloxamerlösung ( $c_{Pol}$ ) subtrahiert. Diese korrigierte Konzentration spiegelt wider, wie viel Wirkstoff allein durch die Lipidnanopartikel solubilisiert wurde und lässt den Anteil in der wässrigen Phase der Dispersion außen vor. Die resultierenden Standardabweichungen für die prozentuale Beladung wurden mit Hilfe der Fehlerfortpflanzung berechnet.

$$\frac{c_D - c_{Pol}}{c_L} \cdot 100 = \text{lipidbezogene Wirkstoffbeladung [\%]} \quad [\text{Gleichung 1}]$$

### 3.2.5 Erzeugung der Wirkstoffbeschichtungen

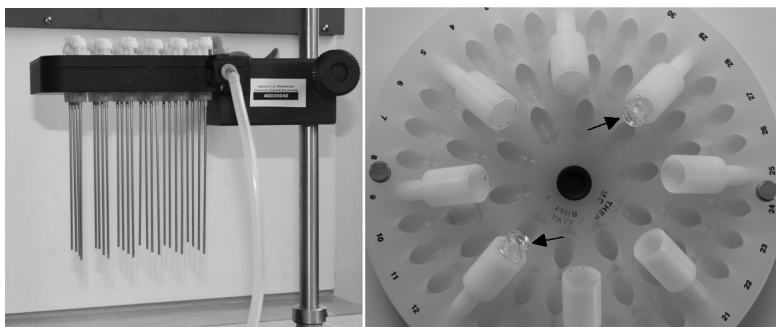
#### 3.2.5.1 Mehrkanal-Evaporator

Bei der Entwicklung der Wirkstoffbeschichtungen wurde zu Beginn ein Mehrkanal-Evaporator (Eva EC S Evaporator, VLM, Bielefeld, Deutschland) eingesetzt (Abbildung 3-4 links). Dieses Gerät besitzt 24 Hohnadeln, an die durch einen gemeinsamen Anschluss ein Stickstoffstrom von etwa 0,5 bar angelegt wurde. Der Gasfluss konnte an jeder einzelnen Nadel durch eine Stellschraube reguliert werden. Die Injektionsgefäße mit den zu verdampfenden Wirkstofflösungen wurden in einem Aluminiumblock unter den Nadeln platziert.

#### 3.2.5.2 Evakuierbare Zentrifuge (SpeedVac)

Für die reproduzierbare Erzeugung von Wirkstoffbeschichtungen wurde eine evakuierbare Zentrifuge verwendet (SpeedVac SPD131DDA, Thermo Electron Corporation, Waltham, USA). Der Unterdruck konnte zwischen 2,67 mbar und 26,7 mbar variiert werden, zur Drehzahl macht der Hersteller keine Angaben. Eine Temperaturkontrolle im Rotorraum war erst ab 45°C aufwärts möglich. Um eventuellen Wirkstoffinstabilitäten bei dieser erhöhten Temperatur vorzubeugen, wurde auf die Temperaturkontrolle verzichtet. Damit die Zentrifuge mit Injektionsgefäßen (2 ml) betrieben werden konnte, wurde in der Feinmechanikerwerkstatt des Instituts (Holger Kubiak) ein Rotoradapter gefertigt (Abbildung 3-4 rechts). Dieser war mit acht Injektionsgefäßen bestückbar.

Für die Herstellung der Beschichtungen wurde aus dem entsprechenden Wirkstoff eine Lösung mit bekannter Konzentration in einem organischen Lösungsmittel hergestellt. Definierte Volumina der frischen Lösung wurden anschließend mit Hilfe von Vollpipetten oder einer Hamiltonspritze in die Injektionsgefäße überführt und diese dann der Zentrifugation im Unterdruck unterworfen. Nach vollständiger Verdampfung des Lösungsmittels und Bildung der Beschichtung wurden die Gefäße bis zur weiteren Verwendung in einem Exsikkator unter Lichtausschluss aufbewahrt.



**Abbildung 3-4:** Links: Mehrkanal-Evaporator. Rechts: Rotoradapter zur Verdampfung von Lösungsmitteln aus den Injektionsgefäßen in der Vakuumzentrifuge. Die Pfeile kennzeichnen eingesetzte Injektionsgefäße.

Tabelle 3-7 gibt eine Übersicht über die Details bei der Herstellung der Beschichtungen. Aus AMPHO, CURC, PORPH und PROP wurden keine Beschichtungen erzeugt. Weil für KuRei300 mit unterschiedlichen Lösungsmitteln und Drücken gearbeitet wurde, sind für diese Substanz die Beschichtungen im Folgenden mit „(Lösungsmittel/ Verdampfungsdruck)“ spezifiziert. Die KuRei300-Beschichtung (Ethanol/ 2,67) wurde beispielsweise aus ethanolischer Lösung bei einem Unterdruck von 2,67 mbar hergestellt.

### 3.2.6 Bestimmung der Löslichkeit verschiedener Wirkstoffe in MCT

Für die Wirkstoffe AMPHO, DIBU, CURC, FENO, MEF, PROP und PORPH wurde die Löslichkeit in MCT abgeschätzt. In Injektionsgefäße (2 ml) wurden je 1 g MCT vorgelegt und eine der Substanzen im Überschuss zugegeben. Jedes Gefäß wurde mit einem Magnetrührkern und einem Stopfen versehen und bei Raumtemperatur auf Stufe 5 für 24 Stunden gerührt (RO 10 Power IKA, Staufen, Germany). Nicht gelöster Wirkstoff wurde anschließend mit einem hydrophoben Filter (HMF) entfernt. Die Wirkstoffquantifizierung erfolgte UV-spektroskopisch (3.2.8.2). Die Gleichung der Kalibriergeraden wurde jeweils als Mittelwert zweier Kurven aus vorangegangenen Experimentreihen zur Wirkstofflokalisierung ermittelt. Für jeden Wirkstoff wurde ein Injektionsgefäß angesetzt

**Tabelle 3-7:** Übersicht über die Details bei der Herstellung der Beschichtungen.

Wirkstoff	Lösungsmittel	Konzentration	Druck	Volumen	Verdampfungszeit
KuRei300	THF	1 mg/ml	2,67 mbar	1 ml	ca. 20 min
			26,7 mbar	1 ml	ca. 20 min
KuRei300	Ethanol	ca. 0,42 mg/ml	2,67 mbar	2,5 ml	ca. 2 h
			26,7 mbar	2,5 ml	ca. 2 h
MEF	Aceton	1 mg/ml	26,7 mbar	0,2 -1 ml	ca. 20 min
DIBU	ACN	10 mg/ml	26,7 mbar	0,5 ml	ca. 40 min
FENO <sup>a</sup>	Aceton	10 mg/ml	26,7 mbar	0,5 ml	ca. 20 min

<sup>a</sup> Nicht alle Beschichtungen kristallisierten spontan; für Experimente wurden nur spontan kristallisierte verwendet.

### **3.2.7 Physikochemische Untersuchungsmethoden**

#### **3.2.7.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)**

Die Partikelgröße der Dispersionen wurde mit dem ZetaSizer Nano Series ZS (ZEN3600, Malvern Instruments) unter 173° Rückstreuung bestimmt. Vor der Messung wurden die Proben mit demineralisiertem Wasser bis zu einer Laserabschwächung von 7 verdünnt. Je Probe erfolgten vier Messungen von jeweils 300 s bei 25°C. Als Ergebnisse sind der z-Average-Durchmesser sowie der Polydispersitätsindex (Pdl) angegeben; es handelt sich dabei um die Mittelwerte aus den letzten drei Messungen.

#### **3.2.7.2 Polarisationslichtmikroskopie und Heiztischmikroskopie**

Ergänzend zur Partikelgrößenbestimmung wurden die Dispersionen unter dem Polarisationslichtmikroskop (Leica DMLM Mikroskop, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) bei 100-200facher Vergrößerung betrachtet. Dies gestattete Aussagen zur physikalischen Stabilität der Dispersionen sowie die Detektion von Wirkstoffkristallen durch Filterübertrag oder Rekristallisation. Fotos wurden mit dem Olympus DP12 Kamerasystem (Olympus, Melville, USA) aufgenommen und mit der Olympus-soft 3.2 Software verarbeitet. Um bestimmte Ergebnisse aus DSC-Untersuchungen besser interpretieren zu können, wurden einige Proben auf einem beheizbaren Objektträger (FP82HT Hot Stage mit Steuereinheit FP90 Central Processor, beides Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) ebenfalls unter dem Polarisationsmikroskop untersucht. Die Heizrate betrug 10°C/min.

#### **3.2.7.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Die Proben wurden auf einen Kupferträger (Carbon Only Copper Grid, 200 Mesh, Science Services, München, Deutschland) aufgebracht und nach kurzer Kontaktdauer bei Raumtemperatur wurden die Überstände mit Filterpapier abgenommen. Für die Negativkontrastierung wurde anschließend eine Uranylacetatlösung (2% m/m) für zwei Minuten einwirken gelassen und die Überstände ebenfalls abgenommen. Die Proben wurden mit dem Leo 922 Omega Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss SMT, Jena, Deutschland) betrachtet, welches mit 200 kV betrieben wurde. Bilder wurden mit dem Proscan CCD Kamerasystem aufgenommen und der ITEM Software bearbeitet.

Einen herzlichen Dank an Katharina Dahl, die die Proben präparierte und die Aufnahmen anfertigte.

#### **3.2.7.4 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)**

Die DSC wurde eingesetzt, um den physikalischen Zustand der Proben zu charakterisieren und gegebenenfalls dessen Veränderung zu verfolgen. Bei den Proben zur Untersuchung der Wirkstofflokalisierung wurde vor der Inkubation der Trimyristingehalt damit eingestellt. Die

Untersuchungen wurden mit dem DSC 1 STAR<sup>e</sup> System (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) vorgenommen. Das Gerät war mit Zink und Indium justiert worden und wurde zusätzlich täglich vor Beginn der Probenmessungen mit Indium kalibriert (Terminologie im Sinne von Mettler Toledo). Eine genau bestimmte Probenmasse (Waage: XS3DU, Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) wurde in die Probentiegel eingewogen und diese anschließend kaltverschweißt. Die Heiz- beziehungsweise Kühlraten betrugen 10°C/min; die Tiegel wurden während der Messung von einem Stickstoffstrom umspült. Die Daten wurden mit der STAR<sup>e</sup> Software 10.00 ausgewertet.

Zur Untersuchung der Wirkstoffbeschichtungen wurden diese mit einer Edelstahlkanüle von Wand und Boden des Injektionsgefäßes gelöst und in die Tiegel überführt. Für diese Proben wurden die Deckel der Tiegel manuell mit einem Loch versehen.

**KuRei300:** Für alle Untersuchungen wurden Seiko-Tiegel (25 µl Aluminiumtiegel, Seiko Instruments, Neu-Isenburg, Deutschland) verwendet.

**Untersuchungen zur Lokalisation der Wirkstoffe:** Die beladenen und unbeladenen Dispersionen wurden ebenfalls in den Tiegeln der Firma Seiko untersucht. Für Beschichtungen wurden Tiegel der Firma Mettler Toledo (40 µl Aluminiumtiegel, Gießen, Deutschland) verwendet.

### 3.2.7.5 Weitwinkelröntgenbeugung (WAXD)

Die WAXD wurde ergänzend zur Aufklärung des physikalischen Zustands (kristallin, teilkristallin, amorph) von Proben genutzt. Zur Aufzeichnung der Röntgendiffraktogramme wurden ein Röntgengenerator (PW3040/60 X'Pert pro; PANalytical, EA Almelo, Niederlande) und ein Goniometer (PW3050/60 MPD-System, ebenfalls PANalytical) verwendet. Das Goniometer war mit einer Kupferanode (PW3373/00 DK147726Cu LFF) und einem Pre FIX X'Celerator Detektor ausgestattet. Die Wellenlänge  $K\alpha$  betrug 1.54 Å; Diffraktogramme wurden in einem Winkelbereich von 3 - 45 °2 $\theta$  mit einer Schrittgröße von 0.017 °2 $\theta$  und einer Rate von 92.39 s pro Schritt aufgenommen. Der Generator wurde mit 40 kV und 40 mA betrieben. Die Messungen wurden für KuRei300 bei 25 °C, bei allen weiteren Proben bei 20 °C auf einem Silizium-Einkristall-Probenhalter durchgeführt. Dieser befand sich auf einem drehbaren Objektisch (PW 3064), der mit einer Umdrehung pro Sekunde rotierte. Die Daten wurden mit dem X'Pert Data Collector 2.1 aufgezeichnet und mit der X'Pert High Score 2.1 Software ausgewertet.

**KuRei300:** Die Beschichtungen wurden innerhalb von 24 Stunden nach der Herstellung untersucht und die Proben dazu mit einer Edelstahlkanüle von der Glaswand gelöst.

### 3.2.7.6 pH-Wert-Messung

Die Ermittlung von pH-Werten erfolgte mit dem Microprocessor pH-Meter 539 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland), welches mit einer Glaselektrode mit Polymerelektrolyt (InLab® Solids, Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) ausgestattet war.

## 3.2.8 Chromatographische und spektroskopische Untersuchungsmethoden

### 3.2.8.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC wurde für die Verfolgung chemischer Veränderungen von KuRei300 sowie zur Bestimmung seiner Konzentration in der mischmizellaren Zubereitung für die *In-vivo*-Studien eingesetzt. Außerdem wurde der Gehalt von Trimyristin in den Dispersionen mit Hilfe der HPLC bestimmt. Das System bestand aus einer Pumpe (515, Waters Corporation, Milford, USA), einem Autosampler (717 plus, Waters) und einem UV-Detektor (486 tunable absorbance detector, Waters). Die Säulen wurden auf 25°C temperiert (W.O. electronics, Langenzersdorf, Österreich) und die mobile Phase vor Gebrauch 20 Minuten mittels Ultraschall entgast. Das Injektionsvolumen betrug 20 µl.

**KuRei300:** Die mobile Phase bestand aus Methanol/Wasser 80/20 (V/V) und wurde mit 0,8 ml/min durch die Säule (Hypersil ODS, 250 mm x 4 mm I.D., 5 µm + 10 mm Vorsäule) gepumpt, woraus ein Druck von etwa 109 bar resultierte. Die Detektionswellenlänge betrug 323 nm und die Retentionszeit für KuRei300 unter diesen Bedingungen etwa 7,3 Minuten. In DMSO gelöstes KuRei300 wurde direkt eingespritzt, ebenso wie die Proben zur Bestimmung der Löslichkeit in Wasser und wässriger Poloxamerlösung. Mischmizellare Proben wurden zuvor in Methanol aufgelöst. In einigen Fällen wurde der Peakflächenanteil von KuRei300 im Chromatogramm bestimmt. Dazu wurde die Gesamtheit aller Peakflächen im Chromatogramm, ohne Berücksichtigung des Injektionspeaks, als 100 % festgesetzt. Für die Quantifizierung von KuRei300 wurde am Tag der Messung eine Kalibrierkurve erstellt.

**Trimyristin:** Die mobile Phase bestand aus THF/ACN 45/55 (V/V) und wurde mit 1,5 ml/min durch die Säule (LiChrospher100, 250 mm x 4 mm I.D., 5 µm + 10 mm Vorsäule) gepumpt, woraus ein Druck von etwa 93 bar resultierte. Die Detektionswellenlänge betrug 234 nm und die Retentionszeit für Trimyristin unter diesen Bedingungen etwa drei Minuten. Die Trimyristindispersionen wurden vor der Injektion in THF/ACN 50/50 (V/V) gelöst und verdünnt. Jede Probe wurde zwei Mal auf diese Weise aufbereitet und jeweils doppelt injiziert. Der Trimyristingehalt wurde mit Hilfe einer Kalibrierkurve, die am Tag der Messung erstellt wurde, ermittelt.

### 3.2.8.2 UV-Spektroskopie

Die Quantifizierung der Wirkstoffe erfolgte mit einem Einstrahlphotometer (Specord 40, Analytik Jena AG, Jena, Deutschland). Dazu wurden die beladenen Dispersionen gelöst und in einer Quarzküvette (halbmikro; Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei entsprechender Wellenlänge vermessen (Tabelle 3-8). Jede Probe wurde zwei Mal aufbereitet und jede Lösung dreifach vermessen, der Mittelwert der Messungen wurde für die Auswertungen herangezogen. Die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes wurde für die vermessenen Konzentrationen nachgewiesen sowie eventuell störende Einflüsse durch Hilfsstoffe ausgeschlossen. Für die Ermittlung der Wirkstoffkonzentrationen wurden Kalibriergeraden der Substanzen in den angegebenen Lösungsmitteln am Tag der Messung erstellt. In einigen Fällen wurde auf eine absolute Quantifizierung verzichtet und lediglich die Absorption als Maß für die Beladung herangezogen.

### 3.2.8.3 Protonen-Kernspinresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -NMR)

Die  $^1\text{H}$ -NMR wurde herangezogen, um die chemische Veränderung von KuRei300 unter Lichteinfluss aufzuklären. Dazu wurde KuRei300 in DMSO- $d_6$  gelöst. Sofort und nach einer Woche Lichtexposition (Tageslicht und Kunstlicht ohne Standardisierung) bei Raumtemperatur wurde die Lösung untersucht (Spektrometer Avance II 600 MHz, Bruker Biospin, Rheinstätten, Deutschland). Als interner Standard diente Tetramethylsilan; die chemische Verschiebung ist in ppm ( $\delta$ -Skala) angegeben.

### 3.2.8.4 Statistische Analyse

Die Ergebnisse der Beladungsquantifizierung von KuRei300 sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben und wurden mit SPSS® 19 auf statistische Signifikanz untersucht. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft. Ein

**Tabelle 3-8:** Wellenlängen und Lösungsmittel für die Quantifizierung der untersuchten Wirkstoffe mittels UV-Spektrometrie.

Substanz	Wellenlänge $\lambda$	Lösungsmittel (V/V)
KuRei300	350 nm	Methanol/THF (80/20)
Amphotericin B	380 nm	THF/DMSO (50/50)
Curcumin	430 nm	THF/Wasser (90/10)
Dibucain	327 nm	THF/Wasser (90/10)
Fenofibrat	288 nm	THF/Wasser (90/10)
Mefenaminsäure	355 nm	THF/Wasser (90/10)
Porphyrin	520 nm	THF/Wasser (90/10)
Propofol	274 nm	THF/Wasser (90/10)

unabhängiger zweiseitiger t-Test wurde dann auf den Vergleich der Beladung mit Pulver beziehungsweise Wirkstoffbeschichtung angewendet, da Normalverteilung vorlag. Beim Vergleich der fünf unterschiedlichen Trägersysteme war das nicht der Fall und es wurde deshalb der Kruskal-Wallis-Test herangezogen. Die p-Werte von  $< 0,05$  und  $< 0,01$  wurden als statistisch signifikant beziehungsweise hochsignifikant angesehen.

### 3.2.9 *In-vivo*-Studien

Alle *In-vivo*-Versuche wurden von Prof. Charles Jaffe (Hebrew University, Hadassah Medical School, Department of Microbiology and Molecular Genetics, Jerusalem, Israel) geplant und durchgeführt. Für die Untersuchung der Wirksamkeit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten KuRei300-Formulierung wurde ein Mausmodell für viszerale Leishmaniose gewählt. Bei diesem Modell werden Mäuse (BALB/c, 7-8 Wochen, etwa 10 – 20 g) über die Schwanzvene mit Promastigoten von *Leishmania donovani* infiziert. Die Behandlung der Tiere kann beispielweise an Tag 14, gegebenenfalls wiederholt an Tag 16, nach der Infektion erfolgen. An Tag 21 bis 28 werden die Tiere getötet und Schnittpräparate der Leber angefertigt. Die Auswertung der Versuche erfolgt über das Auszählen der Parasiten in den Leberschnitten. Ein fester Plan lag vor Beginn der Tierversuche nicht vor. Es sollten jedoch vier Tiergruppen mit je sechs Individuen einbezogen werden: unbehandelt, behandelt mit unbeladenem Vehikel, behandelt mit beladenen Vehikel an Tag 14 sowie mit beladenem Vehikel an Tag 14 und 16. Das peritoneal applizierbare Maximalvolumen beträgt 0,5 ml für eine Maus von 10 g und 1 ml für eine Maus von 20 g. Alle Angaben stammen aus einem schriftlichen Projektbericht von Charles Jaffe [162] sowie aus persönlicher schriftlicher Korrespondenz.

Die Ergebnisse und konkreten Details der tatsächlichen Durchführung sind in schriftlicher Form kommuniziert worden.



## 4 Ergebnisse und Diskussion

Der Übersicht halber sind in Tabelle 4-1 noch einmal grundlegende Charakteristika der verwendeten kolloidalen lipidbasierten Dispersionen zusammengestellt. In die Formulierungsarbeiten an KuRei300 wurden Mischmizellen, Lipofundin® MCT 20 %, unterkühlt-smektische Nanopartikel, kubische Nanopartikel und Liposomen einbezogen. Für die Studien zur Lokalisation von Wirkstoffen und für die Zeitreihen zur passiven Beladung wurden ausschließlich die Trimyristinsysteme untersucht. Genaue Daten zur Partikelgrößencharakterisierung der eingesetzten Chargen finden sich in den jeweiligen Unterkapiteln. Für die Weiterentwicklung der passiven Beladung (4.1) spielten die exakten Partikelgrößen keine Rolle, so dass dafür verschiedene, nicht näher spezifizierte Chargen der verschiedenen Partikelsysteme genutzt wurden.

**Tabelle 4-1:** Wichtige grundlegende Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten kolloidalen lipidbasierten Dispersionen.

Dispersion	Matrix	Stabilisator	Zustand des Lipids	Partikelform	Z-Av.
kubische Nanopartikel	Monoolein	Pol 407	flüssigkristallin	würfelartig	≈ 350 nm
Lipofundin® MCT 20 %	Sojabohnenöl, MCT	Lecithin	flüssig	Kugel	≈ 290 nm
Liposomen	Lecithin	-	-	Hohlkugel	≈ 100 nm
Mischmizellen	Lecithin, Gallensalz	-	-	-	n.b.
u-sm Nanopartikel	Cholesterylmyristat	Pol 188	flüssigkristallin	zylinderartig	≈ 130 nm
E50	Trimyristin	Pol 188	flüssig	Kugel	≈ 50 nm
E100	Trimyristin	Pol 188	flüssig	Kugel	≈ 100 nm
E200	Trimyristin	Pol 188	flüssig	Kugel	≈ 200 nm
E400	Trimyristin	Pol 188	flüssig	Kugel	≈ 400 nm
S50	Trimyristin	Pol 188	fest	flaches Plättchen	≈ 50 nm
S100	Trimyristin	Pol 188	fest	flaches Plättchen	≈ 100 nm
S200	Trimyristin	Pol 188	fest	flaches Plättchen	≈ 200 nm

Z-Av.: Z-Average-Partikeldurchmesser; Pol: Poloxamer; u-sm: unterkühlt-smektisch.

## 4.1 Weiterentwicklung der passiven Beladung

### 4.1.1 Hintergrund

Das Prinzip der passiven Beladung beruht darauf, den Wirkstoff nicht bereits bei der Herstellung des kolloidalen Trägersystems einzuarbeiten, sondern ihn nachträglich zuzusetzen. Das vorgefertigte Trägersystem wird zusammen mit dem Wirkstoff inkubiert und ein entscheidender Schritt besteht darin, nicht solubilisierten Wirkstoff anschließend zuverlässig abzutrennen. Das geschieht am einfachsten durch Filtration. Dabei sollten die Filterporen oder –maschen einerseits so groß wie nötig sein, um die Trägerpartikel passieren zu lassen. Andererseits sollten sie so klein wie möglich sein, um – eventuell sogar mikronisiertes – Wirkstoffpulver zurückzuhalten. Wenn der Größenunterschied zwischen den Partikeln im Trägersystem und den Wirkstoffkristallen ausreichend groß ist, lässt sich relativ leicht ein geeigneter Filter wählen. Mischmizellen und Liposomen beispielsweise ließen sich einfach mit einem Sterilfilter (Membranporengröße 0,22 µm) filtrieren. Problematisch war der Filtrationsschritt bei den relativ großen Kubosomen, unterkühlt-smektischen Nanopartikeln, den größeren Emulsionströpfchen (ab 200 nm) und vor allem den sehr anisometrischen Lipidkristallen der Suspensionen. Bei diesen ließen sich die Systeme mit einer mittleren Partikelgröße von 100 nm (S100) schon nicht mehr durch Membranfilter der Porengröße 0,22 µm filtrieren. Für Partikel um die 200 nm war auch die Porengröße 0,45 µm keine Option mehr. Für die relativ großpartikulären Systeme mussten Glasfaserfilter eingesetzt werden (GF 0,4 oder GF 0,7), weil die Membranfilter verstopften. Die Glasfaserfilter führten allerdings zum Übertrag winziger, nicht gelöster Wirkstoffkristalle ins Filtrat. Diese Kristalle waren zu klein, um sie unter dem Polarisationsmikroskop mit dem Kamerasystem zu fotografieren. Bei dunkler Einstellung des Sichtfeldes waren sie aber mit dem Auge deutlich wahrnehmbar. Eine aussagekräftige Bestimmung der Beladung war unter den beschriebenen Umständen nicht möglich.

Alternativ zur Filtration wurde das Abtrennen von nicht solubilisiertem Wirkstoff durch Zentrifugation versuchsweise getestet. Erste Experimente waren nicht erfolgreich und bei Anwendung hoher Drehzahlen (Ultrazentrifugation) wären mit großer Wahrscheinlichkeit Komplikationen beispielweise in Form stark aggregierter und im Fall der Suspensionen auch sedimentierter Dispersionspartikel aufgetreten. Der Ansatz wurde daher nicht systematisch weiterverfolgt. Um dennoch alle kolloidalen Dispersion mittels passiver Beladung auf ihre Eignung als Trägersysteme untersuchen zu können, wurden Wirkstoffbeschichtungen entwickelt.

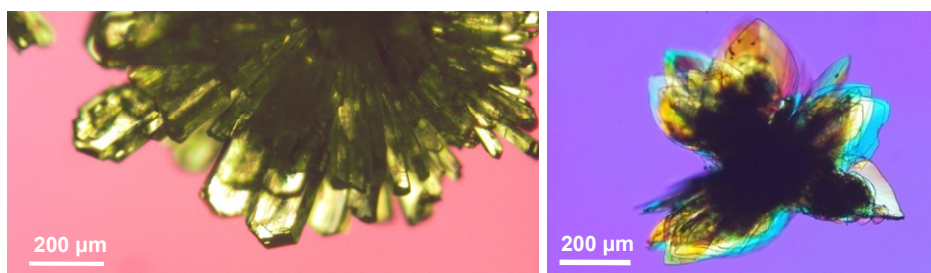
Neben dem Lösen der Filtrationsproblematik war ein weiterer Aspekt, die passive Beladung im Hinblick auf die eingesetzten Mengen an Wirkstoff und an Testdispersionen noch weiter zu miniaturisieren.

#### 4.1.2 Entwicklung der Wirkstoffbeschichtungen

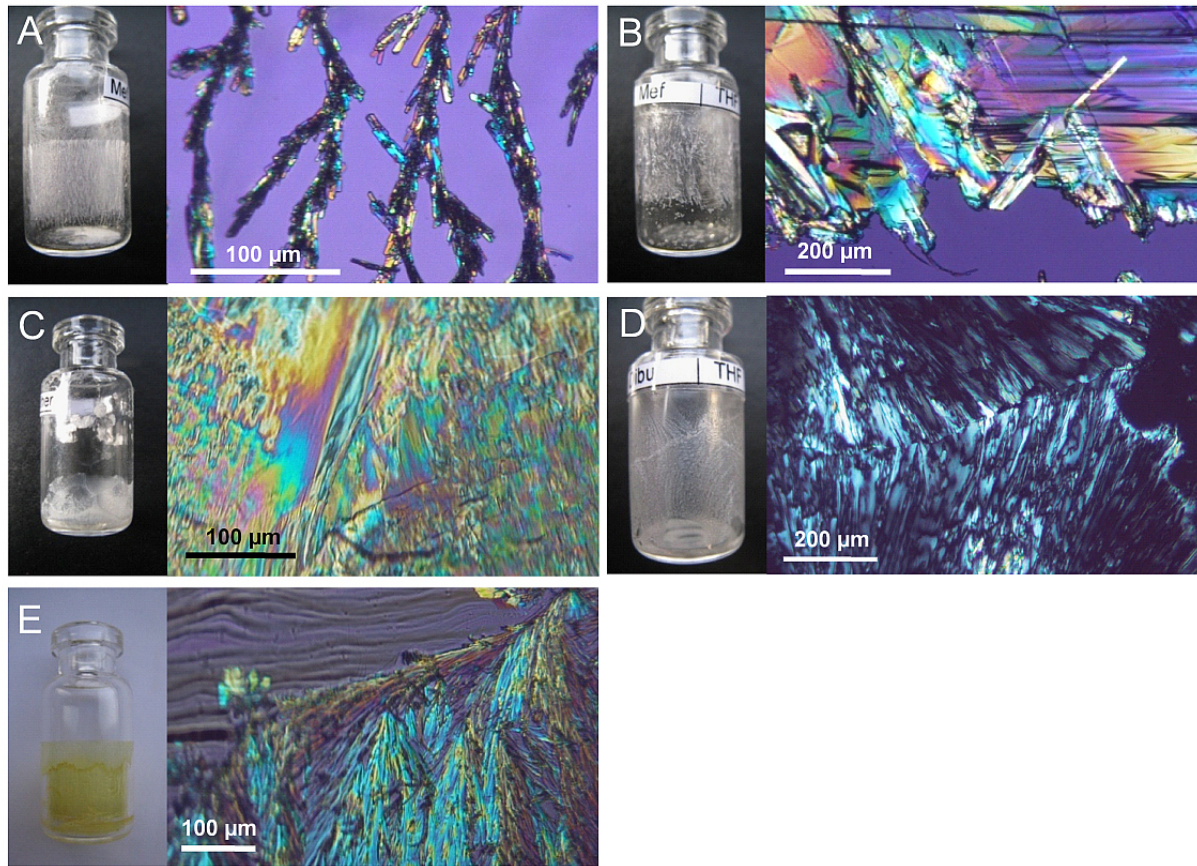
Die kritischen Parameter beim Filtrationsschritt sind die Größe der Dispersionspartikel, die Größe der Wirkstoffkristalle und die Poren- oder Maschengröße des Filters. Die Größe der Dispersionspartikel war durch die Art der Dispersion und das Design der Experimente weitestgehend vorgegeben. Da die Auswahl der Filter bereits erschöpft war, lag es nahe, größer kristalline Wirkstoffe einzusetzen. Von Seiten der Hersteller wird meist nur feinkristallines oder sogar mikronisiertes Material angeboten, weil dies für die weitere Verarbeitung in der Regel vorteilhaft ist.

Das Gewinnen größerer Kristalle ist prinzipiell durch Umkristallisation möglich. Erste Versuche wurden mit MEF, DIBU, BTMV und KuRei300 durchgeführt und dazu organische Lösungen (circa 2 ml) dieser Wirkstoffe in Glasgefäßen unter dem Abzug abdampfen gelassen. Als Lösungsmittel wurden Diethylether, Chloroform, Aceton, THF, ACN, Ethanol, Isopropanol, Essigester und teilweise Mischungen daraus verwendet. Das Aussehen der gebildeten Wirkstoffrückstände nach dem Abdampfen wurde makroskopisch und polarisationsmikroskopisch beurteilt. Je nach Wirkstoff und Lösungsmittel bildeten sich größere Einzelkristalle (Abbildung 4-1), flächige kristalline Beschichtungen an Gefäßwand und -boden (Abbildung 4-2) oder lackartige Rückstände im Gefäß. Die lackartigen Rückstände ließen sich mitunter auch durch Kratzen am Glas nicht zur Kristallisation bringen. Je nach Lösungsmittel variierte die Abdampfzeit bis zur Trockne: Diethylether, Chloroform, Aceton: etwa 24 h; THF und Essigester: etwa 48 h; ACN: etwa 72 h, Ethanol und Isopropanol: länger als 96 h.

Nachteilig war, dass die Resultate – vermutlich durch einen nicht konstanten Abluftstrom im Abzug – schlecht reproduzierbar waren. Zudem ließen sich die Kristalle und kristallinen



**Abbildung 4-1:** Resultate der Verdampfung von organischen Lösungen verschiedener Wirkstoffe unter dem Abzug. Die Einzelkristalle wurden für polarisationsmikroskopische Aufnahmen aus den Injektionsgefäßen herauspräpariert. Links: Einzelkristall von Metforminsäure aus THF/ACN (80/20), rechts: Einzelkristall von KuRei300 aus Ethanol.



**Abbildung 4-2:** Resultate der Verdampfung von organischen Lösungen verschiedener Wirkstoffe unter dem Abzug. Die polarisationsmikroskopischen Bilder der resultierenden Beschichtungen wurden direkt durch die Wand der Injektionsgefäße aufgenommen. A: Mefenaminsäure (MEF) aus Ether, B: MEF aus THF, C: Dibucain (DIBU) aus Ether, D: DIBU aus THF, E: KuRei300 aus Ethanol.

Beschichtungen schlecht vom Glas lösen, um sie für die Beladung zu gewinnen. Aus diesem Grund wurden alle folgenden Beschichtungsversuche direkt in den für die Beladungsexperimente verwendeten Injektionsgefäßen durchgeführt. Ein Transfer des Wirkstoffs wurde somit umgangen.

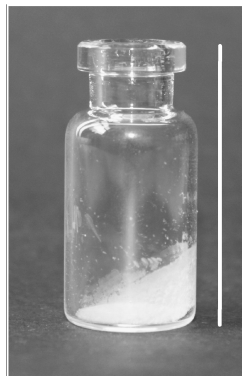
Bei Beladungsversuchen mit Trimyristinnanoemulsionen und –suspensionen lösten sich die Beschichtungen je nach Wirkstoff und Lösungsmittel entweder als Bruchstücke von der Glaswand oder auch nicht. Die erzeugten Kristalle und Beschichtungsbruchstücke waren in den allermeisten Fällen groß genug, um von Glasfaserfiltern (GF 0,4) zurückgehalten zu werden. Die Abwesenheit von Kristallen im Filtrat wurde polarisationsmikroskopisch überprüft. In wenigen Fällen waren einzelne Lichtreflexe von winzigen Kristallen zu sehen. Die Verbesserung im Vergleich zu den unbehandelten Wirkstoffpulvern war aber so erheblich, dass das Ziel erreicht war, auch Nanodispersionen passiv beladen zu können, deren Partikel Membranfilter (Porengröße 0,22 µm oder 0,45 µm) nicht passieren. Das macht die Beschichtungen wertvoll für die Untersuchung von grundlegenden Fragestellungen zur passiven Beladung (4.3).

### 4.1.3 Optimierung des Herstellungsverfahrens für die Beschichtungen

Da das Verdampfen der Lösungsmittel unter dem Abzug zu schlecht reproduzierbaren Ergebnissen führte und zudem relativ viel Zeit in Anspruch nahm, wurde nach einer alternativen Möglichkeit gesucht. Zunächst wurde ein Mehrkanal-Evaporator getestet, mit dem aus Hohladeln Stickstoff auf 24 Proben gleichzeitig geblasen werden kann (Abbildung 3-4). Den zentral zugeführten Stickstoffstrom für alle Hohladeln identisch zu justieren war jedoch schwierig. Außerdem nahmen mit abnehmenden Restvolumina der Lösungsmittel in den Probengefäßen Verwirbelungen stark zu, so dass die Wirkstofflösungen an den Gefäßwänden hochspritzten. Die Beschichtungen waren daher sehr uneinheitlich und die Ergebnisse wenig zufriedenstellend.

Als bessere Alternative erwies sich die evakuierbare Zentrifuge SpeedVac. In einen selbst angefertigten Rotoradapter (Feinmechanikerwerkstatt des Instituts) konnten acht Injektionsgefäße mit organischen Wirkstofflösungen platziert werden (Abbildung 3-4). Der Unterdruck konnte zwischen 2,67 mbar und 26,7 mbar gewählt werden. Durch diese relativ gut definierten Verdampfungsbedingungen gelang es, sehr reproduzierbar Beschichtungen herzustellen (Abbildung 4-3). Wünschenswert wäre allerdings gewesen, den Rotorraum auch unter 45°C temperieren zu können, weil sich in bestimmten Fällen die Temperatur als kritischer Parameter erwies (4.2.5). Die Verdampfungszeiten konnten mit Hilfe der SpeedVac, je nach Lösungsmittel und Volumen auf 20 Minuten bis zwei Stunden reduziert werden.

Um ein breites Größenspektrum an Nanodispersionen untersuchen zu können, wurde versucht, für jeden Wirkstoff Beschichtungen zu erzeugen. Für die Wahl des Lösungsmittels wurden die Aspekte Wirkstoff-Lösevermögen, Verdampfungsgeschwindigkeit und Erscheinungsbild der Beschichtung berücksichtigt. Demnach zeichnete sich ein gut geeignetes Lösungsmittel in erster Linie durch ein hohes Lösevermögen, schnelles Verdampfen und Erzeugung einer grobkristallinen Beschichtung aus. Für die Arbeiten mit KuRei300 und die Untersuchungen zur Wirkstofflokalisation konnten aus folgenden



**Abbildung 4-3:** Beschichtung von Fenofibrat aus Aceton hergestellt in der evakuierbaren Zentrifuge SpeedVac. Der Balken entspricht 3,5 cm.

Wirkstoff-Lösungsmittel-Kombinationen nutzbare Beschichtungen erzeugt werden: KuRei300/ THF, KuRei300/ Ethanol, DIBU/ ACN, FENO/ Aceton und MEF/ Aceton.

Für die fertigen Beschichtungen stellte sich die Frage, ob sich eventuell noch geringste Mengen Restlösungsmittel darin befanden. Weder optisch noch olfaktorisch gab es Hinweise darauf. Zusätzlich wurden von den Beschichtungen Thermogramme aufgenommen, die in 4.2.5 und 4.3.6 besprochen werden. Bei schwer interpretierbaren Ergebnissen hätten gegebenenfalls zusätzlich Methoden wie die Thermogravimetrie oder Head-Space-Gaschromatographie herangezogen werden können.

### **4.1.4 Ansätze für die weitere Miniaturisierung der passiven Beladung**

Die bei der passiven Beladung eingesetzten Volumina der Trägersysteme (etwa 1,5-2 ml) sind im Vergleich zur klassischen Beladung bei beispielsweise der Hochdruckschmelzhomogenisation bereits verhältnismäßig klein. Homogenisatoren für den Labormaßstab benötigen je nach Hersteller deutlich größere Verarbeitungsvolumina. Aus der eigenen praktischen Erfahrung und der von Kollegen waren dies etwa 30 ml für den APV Gaulin Micron Lab 40, 200 ml für den Panda (Niro Soavi, Parma, Italien) und 40 ml für den Microfluidizer. Im Sinne des Einsatzes der passiven Beladung als Screening-Methode wären trotzdem noch kleinere Volumina als 2 ml wünschenswert.

Bei der Evaluation verschiedener Ansätze wurde darauf Wert gelegt, die Beladung optisch an Hand von Wirkstoffresten beurteilen zu können. Für das Testen eines bestimmten Trägersystems für einen Wirkstoff bedeutet das, dass zunächst in einer Reihe von Probengefäßen jeweils eine definierte, steigende Masse von Wirkstoff vorgelegt wird. Anschließend wird jedes Gefäß mit dem selben Volumen des Trägersystems versetzt und inkubiert. Nach der Inkubation kann mit bloßem Auge oder unter dem Mikroskop beurteilt werden, ob und wie viel Wirkstoff noch ungelöst in welcher Probe vorliegt. Solch eine halbquantitative Abschätzung des Solubilisationsvermögens eines Trägersystems kommt ohne Filtrationsschritt und Kalibrierkurve aus.

#### **Objektträger**

In Objektträger mit eingeschliffener Mulde (Hersteller unbekannt) konnten maximal 50 µl einer Testemulsion (Trimyristin stabilisiert mit Poloxamer 188, nicht näher spezifiziert) eingebracht werden. Um Verdunstungsverluste zu vermeiden, wurde vor dem Auflegen eines planen Objektträgers als Deckel ein vaselinbestrichener O-Ring zwischengelegt. Nach 24-stündiger Lagerung bei 20°C hatte sich reichlich Kondenswasser unter dem oberen Objektträger gebildet, was bei dem kleinen Gesamtvolumen zur Verfälschung der Ergebnisse führen würde. Neben der Schwierigkeit, die Konstruktion angemessen für die Inkubation bewegen zu können, war dies ein Aspekt, weshalb der Ansatz als wenig

praktikabel eingeschätzt wurde. Er wurde daher verworfen, ohne ihn mit Wirkstoff getestet zu haben.

### **HPLC-Probengefäße**

Für diesen Ansatz wurden fünf zylinderförmige HPLC-Probengefäße (Fassungsvolumen 1 ml) mit Stopfen verwendet. In diese wurden 40, 80, 120, 160 oder 200 µl einer MEF-Lösung (7,5 mg/ml THF) mit Hilfe einer Hamiltonspritze überführt und unter dem Abzug abdampfen gelassen. Für die Inkubation wurden jeweils 300 µl einer Testemulsion zu den entstandenen Wirkstoffkristallen pipettiert und die Probengefäße auf dem Rotator platziert. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Gefäße kurz ruhen gelassen, um nicht solubilisierten Wirkstoff sedimentieren zu lassen. Optisch ließen sich die Restmengen an Wirkstoff entsprechend der ursprünglich vorgelegten Massen von 0,3 – 1,5 mg richtig zuordnen. Prinzipiell funktioniert diese Methode also, um den Konzentrationsbereich des Solubilisationsvermögens eines Trägersystems einzugrenzen. Es wäre allerdings vorteilhaft, exakte Mengen des Wirkstoffs ohne Verwendung einer organischen Lösung in die Gefäße vorlegen zu können. Beim Verdampfen der organischen Lösungsmittel kann der Wirkstoff in einer veränderten physikalischen Form anfallen. Für schnellere Trocknungsprozesse wie die Sprühtrocknung wurde dies beschrieben [176,177] und ist auch bei der Nutzung einer evakuierbaren Zentrifuge für KuRei300 in dieser Arbeit aufgetreten (4.2.5). Die physikochemische Charakterisierung erfordert jedoch zusätzliche Substanz, die in der frühen Entwicklungsphase eines Wirkstoffkandidaten in der Regel nur sehr begrenzt zur Verfügung steht. Das direkte Einwiegen eines Wirkstoffs in die Probengefäße war nicht möglich, da ihre Masse für die Nutzung der Ultrafeinwaage zu hoch war. Eventuell könnte ein DSC-Tiegel als Wägeschiffchen dienen und mit ins Probengefäß gegeben werden.



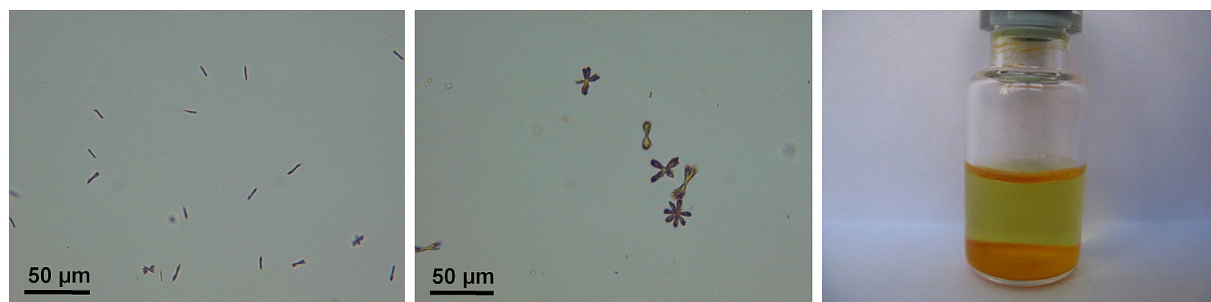
## 4.2 Präklinische Formulierung von KuRei300

### 4.2.1 Hintergrund der galenischen Aufgabenstellung

#### 4.2.1.1 Applikationsproblematik in zurückliegenden *In-vivo*-Studien

Die schlechte Wasserlöslichkeit von KuRei300 führte zu schwerwiegenden Applikationskomplika-tionen in den zurückliegenden, bereits in der Einleitung angesprochenen *In-vivo*-Studien. In diesen war mit *L. donovani* infizierten Mäusen eine Zubereitung von KuRei300 intraperitoneal appliziert worden. Da die Substanz praktisch unlöslich in Wasser ist, war ein Vehikel aus 150 µl Ethanol, 350 µl Tween® 80, 500 µl DMSO und 4000 µl Wasser gewählt worden, in dem sich 25 mg KuRei300 befanden (schriftliche Kommunikation mit Nina Sacerdotisierra aus der Arbeitsgruppe von Prof. Jaffe). Die Problematik bestand darin, dass sich KuRei300 zwar zunächst in diesem Vehikel löste, allerdings rasch wieder ausfiel [162]. Um einen Eindruck von der Geschwindigkeit und dem Ausmaß der Präzipitation zu gewinnen, wurde die Mischung nochmals selbst angefertigt. Bereits nach 90 Minuten wuchsen etwa 10 µm große, garbenartige Kristallbündel, deren Größe zunahm und die etwas später einen deutlich sichtbaren Bodensatz bildeten (Abbildung 4-4). Im Rahmen der zurückliegenden *In-vivo*-Studien fiel zusätzlich zur Niederschlagsbildung im Vehikel bei Obduktion der behandelten Mäuse eine markante Färbung der leberumgebenden Membranen auf [162]. Da KuRei300 ebenfalls eine kräftig orange-gelbe Farbe besitzt, wurde die Verfärbung auf Ablagerungen der Substanz zurückgeführt.

Bedingt durch die (teilweise) Präzipitation von KuRei300 sowohl vor als offensichtlich auch nach der Applikation ist nicht bekannt, in welcher Konzentration es zu welchem Zeitpunkt gelöst vorlag. Da der molekulardisperse Zustand in der Regel die Voraussetzung für die Bioverfügbarkeit einer Substanz ist, konnten daher keine konkreten Aussagen über toxische



**Abbildung 4-4:** Präzipitation von KuRei300 aus dem ursprünglich für die *In-vivo*-Studien gewählten Vehikel. Links: 90 Minuten nach Herstellen der Lösung; Mitte und rechts: 18 Stunden nach Herstellen der Lösung. Die Lösung enthielt im Mengenverhältnis 150 µl Ethanol, 350 µl Tween® 80, 500 µl DMSO, 4000 µl Wasser sowie 25 mg KuRei300. Die beiden linken Bilder zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen.



oder effektive Dosierungen getroffen werden. Für aussagekräftige Studien ist die galenisch einwandfreie Formulierung der untersuchten Substanz eine unabdingbare Voraussetzung. Darüberhinaus kann die Präzipitation von Substanzen in den Blutgefäßen Phlebitis und Zellabrasionen verursachen [178].

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, eine parenterale Darreichungsform für KuRei300 zu entwickeln, die für erneute *In-vivo*-Studien mit Mäusen eingesetzt werden sollte.

#### **4.2.1.2 Anforderungen an die zu entwickelnde Formulierung**

Präklinische Studien werden an Tieren durchgeführt und beinhalten pharmakologische, pharmakokinetische und toxikologische Untersuchungen. Die Strategie für die Entwicklung einer präklinischen Formulierung hängt neben anderen Faktoren auch von dem angestrebten Applikationsweg und der Behandlungsdauer später beim Menschen ab [179]. Obwohl die Studien zunächst am Tiermodell stattfinden, sollte die Formulierungsentwicklung am Endanwender Mensch orientiert sein, um nicht in der klinischen Phase nochmals galenische Anstrengungen unternehmen zu müssen, die unter Umständen auch scheitern können [3,179]. Häufige Applikationsrouten sind die orale und parenterale im Sinne von intravenös oder intraperitoneal. Der Vorteil der intravenösen Gabe besteht darin, dass die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs definitionsgemäß 100 % beträgt. Auch an präklinische Formulierungen werden Anforderungen gestellt bezüglich der Toxizität und des regulatorischen Status der Hilfsstoffe und gegebenenfalls weiterer Parameter wie Osmolarität, pH-Wert oder Endotoxingehalt. Ein schöner Überblick dazu findet sich bei Shah et Agnihotri [179]. Behörden wie die FDA und Gremien wie das ICH (International Congress on Harmonization) geben Richtlinien für die präklinische Entwicklung von Wirkstoffen in der pharmazeutischen Industrie heraus.

Das DFG-Teilprojekt für die Formulierung von KuRei300 enthielt keine konkreten Anforderungen. Gemeinsam mit Charles Jaffe wurde trotz der eingeschränkten Aussagekraft der vorangegangenen *In-vivo*-Studien eine Dosis von 100 mg/ Kg (Einzeldosis) für die Prüfung auf Wirksamkeit festgelegt [162]. Bei einer Maus mit einem Gewicht von 10 g und maximalen Applikationsvolumina von 0,1 ml auf intravenösem und 0,5 ml auf peritonealem Weg resultierten daraus Zielkonzentrationen von 10 mg/ml beziehungsweise 2 mg/ml. Osmolarität und pH-Wert wurden von Charles Jaffe nicht als kritische Parameter eingeschätzt (schriftliche Kommunikation). Ein bestimmtes Konservierungsmittel wurde nicht gewünscht, allerdings sollte auf Natriumazid verzichtet werden.

Die weiteren Anforderungen waren selbst definiert. Hilfsstoffe sollten möglichst für die parenterale Applikation am Menschen zugelassen sein oder zumindest eine geringe Toxizität erwarten lassen. Um die Formulierung sowohl intraperitoneal als auch intravenös applizieren zu können, sollten mögliche Dispersionspartikel eine mittlere Größe von 500 nm nicht

überschreiten. Die Zubereitung sollte autoklaviert oder unter aseptischen Bedingungen sterilfiltriert werden können. Schlussendlich wurde eine Haltbarkeit der substanzhaltigen Zubereitung von etwa vier Wochen angestrebt, um einen angemessenen Zeitraum zwischen der Formulierung und der Durchführung der *In-vivo*-Studien überbrücken zu können.

Exemplarisch für die frühe Entwicklungsphase von Wirkstoffkandidaten stand für die galenischen Arbeiten nur eine sehr geringe Substanzmenge von etwa 800 mg zur Verfügung.

### 4.2.2 Physikochemische Charakterisierung von KuRei300

Über die physikochemischen Eigenschaften von KuRei300 lagen zu Beginn der Formulierungsarbeit fast keine Angaben vor. Die Wasserlöslichkeit wurde als „sehr schlecht“ bezeichnet, die in DMSO hingegen als gut. Es war außerdem bekannt, dass sich die Festsubstanz bei 274°C zersetzt, die Stabilität in Lösung war unbekannt. Der theoretische logP war mit 5,28 angegeben (berechnet mit ChemBioDrawUltra V 12.0.2; Wert von Dr. J. Ryczak übermittelt) und ließ vermuten, dass lipidbasierte Trägersysteme für die Solubilisierung geeignet sein könnten.

#### 4.2.2.1 Untersuchungen zur Löslichkeit

##### Wasser

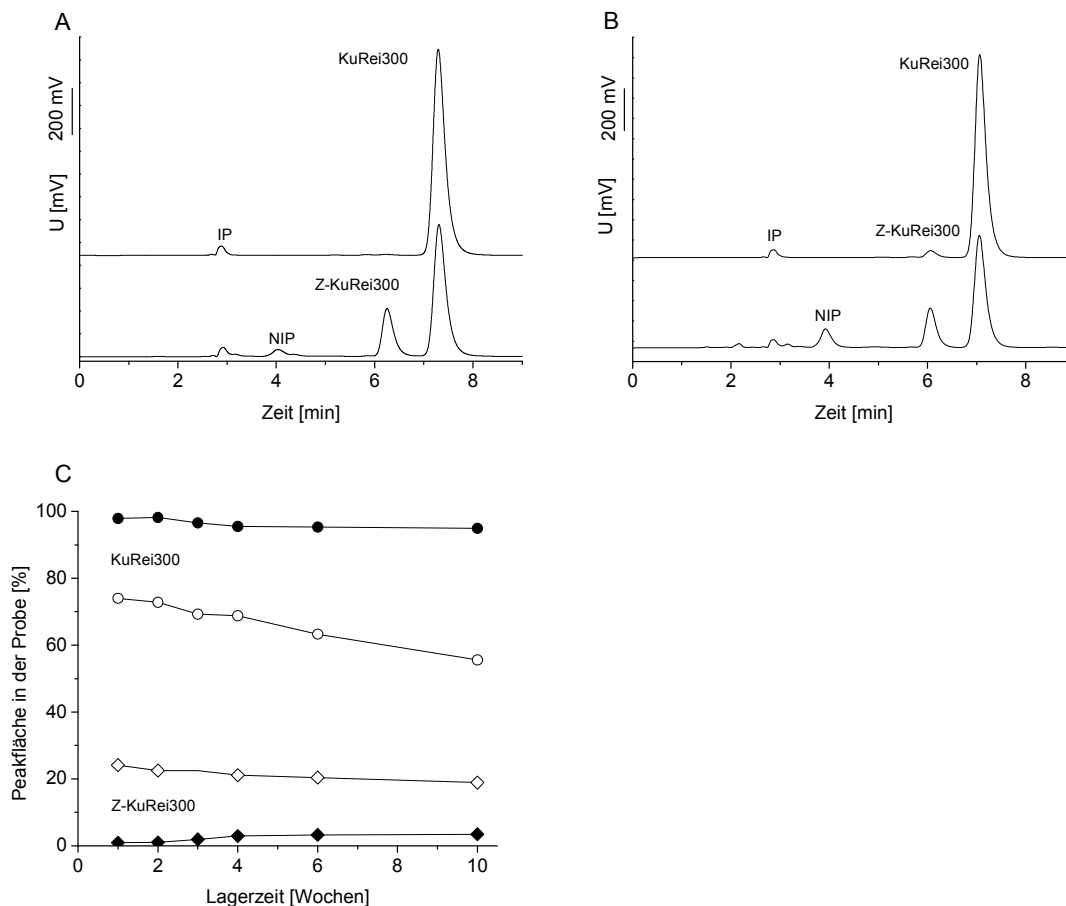
In reinem Wasser war KuRei300 nicht benetzbar und flotierte. Selbst mittels HPLC war nach 24-stündiger Inkubation keinerlei Substanzsignal detektierbar. An Hand der Konzentrationen, die für die Kalibriergerade verwendet wurden, kann die unter diesen Bedingungen ermittelte Wasserlöslichkeit mit unter 2 µg/ml angegeben werden.

##### Organische Lösungsmittel

DMSO und THF waren die mit Abstand besten Lösungsmittel und lösten beide mindestens 1 mg/ml. Ethanol löste nur etwa 0,42 mg/ml. Entsprechend ihrer Lösungseigenschaften lassen sich die getesteten Lösungsmittel folgendermaßen reihen: DMSO ≈ THF > Methanol > Aceton ≈ ACN ≈ Isopropanol. Obwohl Ethanol ein geringeres Lösungsvermögen für KuRei300 besaß als THF und DMSO, stellte es eine gute Alternative für die Erzeugung von Beschichtungen dar. DMSO ist auf Grund seines geringen Dampfdrucks für die Verdampfung kaum geeignet. THF ist wesentlich toxischer als Ethanol und daher im Hinblick auf mögliche Rückstände in der Beschichtung für die Herstellung von Zubereitungen für *In-vivo*-Versuche eher kritisch zu sehen. Die oralen LD<sub>50</sub>-Werte für Ratten betragen bei THF 2050-2850 mg/Kg und bei Ethanol 7060 mg/Kg (Angabe in den Sicherheitsdatenblättern des Chemikalienhändlers Sigma Aldrich).

### 4.2.2.2 Stabilitätsuntersuchung in Lösung

DMSO hatte sich als gutes Lösungsmittel erwiesen und ist zudem ein übliches Co-Solvens für schwer wasserlösliche Substanzen in *In-vivo*- und *In-vitro*-Studien. Deshalb wurde die chemische Stabilität von KuRei300 in DMSO-Lösung untersucht und mittels HPLC beurteilt. Den Proben wurde etwas Wasser (4%) zugefügt, da DMSO für *In-vivo*- und *In-vitro*-Studien immer in wässriger Mischung verwendet wird. Die Lösungen (0,23 mg KuRei300/ml) wurden entweder unter Laborbedingungen (Raumtemperatur, künstliches und natürliches Licht) oder im Kühlschrank (4-8°C, dunkel) gelagert und wöchentlich beurteilt. In der lichtexponierten Probe nahm der Anfangsgehalt von KuRei300 rapide ab und es trat im Chromatogramm ein neuer Peak auf (Abbildung 4-5). Nach einer Woche machte KuRei300 nur noch 74% der Peakfläche im Gesamtchromatogramm aus. Für die neue, zunächst unbekannte Verbindung,



**Abbildung 4-5:** HPLC-Untersuchungen zur chemischen Stabilität von KuRei300 in gering wasserhaltiger DMSO-Lösung. A: Chromatogramme einer lichtexponierten Lösung; oben: frisch, unten: eine Woche alt. B: Chromatogramme zweier Lösungen nach sechs Wochen; oben: Kühlschranklagerung, unten: Lagerung unter Laborbedingungen einschließlich Lichtexposition. C: Entwicklung des Peakflächenanteils von KuRei300 am Gesamtchromatogramm in Abhängigkeit von den Lagerbedingungen. Zum Zeitpunkt 0 Wochen wurden die Proben nicht analysiert; der Peakflächenanteil von KuRei300 entsprach in frischen Proben naturgemäß 100 % (vgl. A). KuRei300: ○/●, Z-KuRei300 ◇/◆; die hellen Symbole kennzeichnen Lichtexposition und die dunklen Kühlschranklagerung. IP: Injektionspeak; NIP: nicht identifizierter Peak.

die später als Z-KuRei300 identifiziert wurde (Abbildung 4-6), betrug der Anteil 24% (Abbildung 4-5). Bei weiterer Lagerung nahm der Gehalt an Z-KuRei300 nur langsam ab. Der Gehalt von KuRei300 sank allerdings deutlich und zwar in dem Maß, wie die Konzentration einer dritten, nicht identifizierten Verbindung zunahm. Vermutlich liegen die beiden Isomere in einem Gleichgewicht vor und die tatsächliche chemische Zersetzung geht von E-KuRei300 aus. Die Lagerung im Kühlschrank verlangsamte die Umlagerungsprozesse beträchtlich (Abbildung 4-5). Nach einer Woche betrug der Peakflächenanteil von E-KuRei300 immer noch 98% und der des Z-Isomers lediglich 1%. Im weiteren Verlauf des Untersuchungszeitraums stabilisierte sich das Verhältnis bei etwa 95% zu 3% (Abbildung 4-5). Weitere Verbindungen wurden nicht in nennenswerten Mengen gefunden.

Als Konsequenz dieser Ergebnisse wurden Beladungs- und Lagerstudien sofern nicht anders gekennzeichnet unter Lichtausschluss und vorsorglich unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Probandaten aus einer Gefrierschranklagerung (-20°C, Daten hier nicht gezeigt) wiesen darauf hin, dass eher Licht als Temperatur der kritische Parameter ist. Es sprach daher nichts dagegen, die Proben wie üblich bei 20°C zu lagern.

### 4.2.2.3 Strukturaufklärung des Lagerproduktes in Lösung

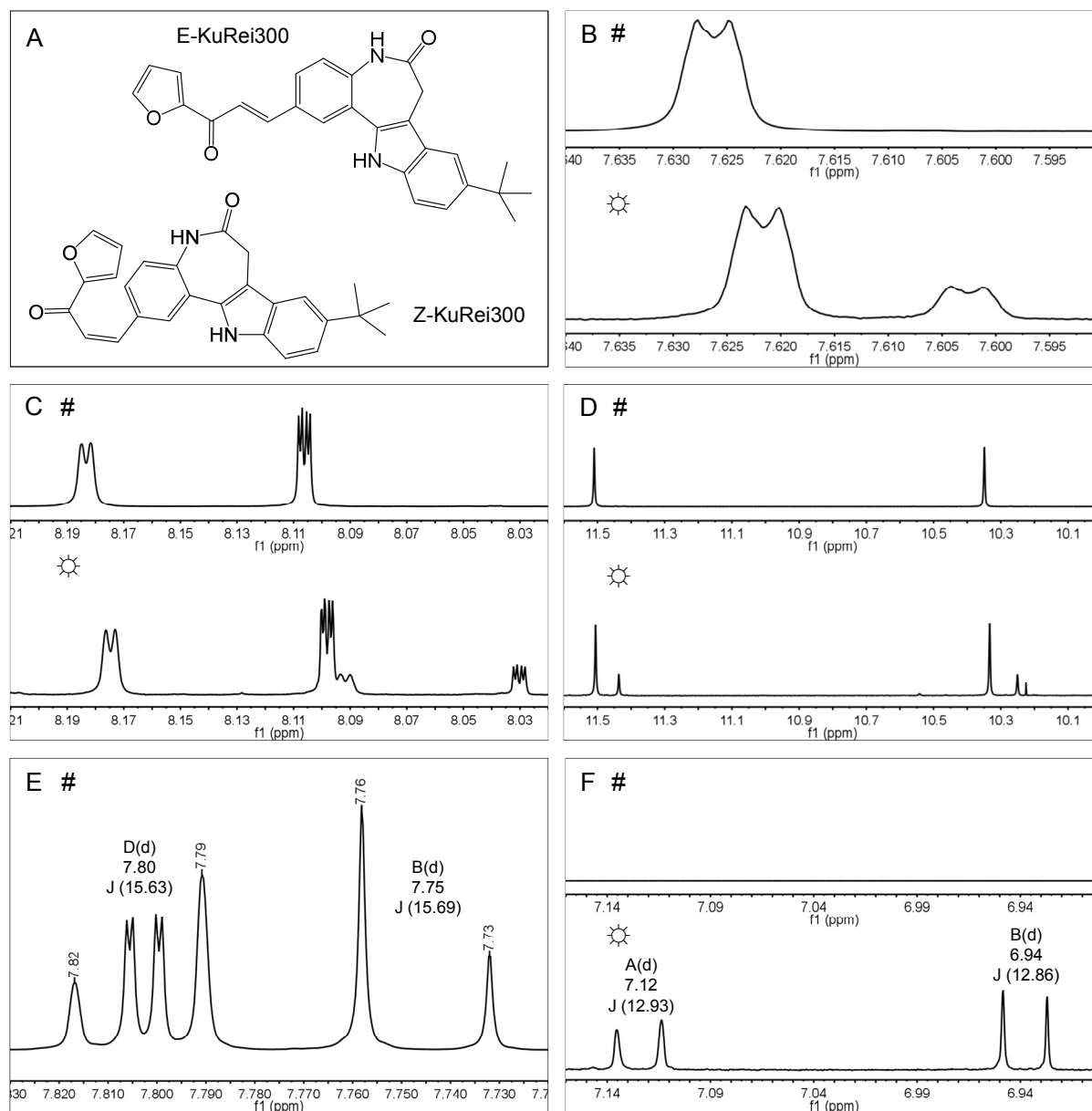
Die Aufklärung der chemischen Struktur der neu gebildeten Substanz war vor allem aus zwei Gründen von Interesse. Zum einen war die rasche Bildung an sich relativ unerwartet, weil die Molekülstruktur von KuRei300 keine hohe chemische Instabilität nahelegte. Zum anderen überraschte das Ausmaß, in dem die Substanz detektiert wurde. Prinzipiell wären für chemische Veränderungen am KuRei300-Molekül verschiedene Szenarien vorstellbar. Wenn das Molekül anfällig für die hydrolytische Spaltung des Lactams wäre, müssten sich die entsprechend neu gebildeten NH<sub>2</sub>- und COOH-Gruppen nachweisen lassen. Eine andere denkbare Möglichkeit wäre die Kontraktion des Azepinrings. Diese Reaktion wurde bereits für Kenpaullon, die Leitstruktur von KuRei300, in Lösung beobachtet [180]. In diesem Fall würde sich ebenfalls eine COOH-Gruppe bilden. Um diese Reaktionen zu bestätigen oder auszuschließen, bietet sich die NMR-Spektroskopie an. Es wurden daher <sup>1</sup>H-NMR-Spektren einer frischen und einer lichtexponierten, gealterten Lösung (1,4 mg KuRei300 in DMSO; Lagerprobe eine Woche alt) aufgenommen.

Für die frische Probe stimmten die Signale (Anhang A1) hervorragend mit den Daten von C. Reichwald überein [181]. Im Spektrum der lichtexponierten Probe gab es weder Signale für NH<sub>2</sub>- noch für COOH-Gruppen, was gegen beide der oben diskutierten möglichen Abläufe spricht. Da in diesem Spektrum allerdings alle Signale verdoppelt waren (Abbildung 4-6 B - D), wurde eine E-Z-Isomerisierung vermutet [182]. Dementsprechend zeigte das Spektrum dann auch zusätzlich ein neues AB-System<sup>3</sup> für die Protonen der Z-Doppelbindung

---

<sup>3</sup> Kopplung von zwei Protonen mit ähnlicher chemischer Verschiebung

mit einer Hochfeldverschiebung der Signale und einer verminderten Kopplungskonstante  $J$  (Abbildung 4-6 E und F). Die Reduktion der Kopplungskonstante von etwa 15,7 Hz auf 12,9 Hz stimmte gut mit der Literatur überein [183,184]. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass es sich bei der unter Lichteinfluss gebildeten Verbindung tatsächlich um Z-KuRei300 handelt (Abbildung 4-6 A). Dieser Schluss wird dadurch untermauert, dass die Peakflächenverhältnisse von etwa 3:1 zwischen E- und Z-KuRei300 für



**Abbildung 4-6:**  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopischer Nachweis der Photoisomerisierung von KuRei300. A: chemische Strukturformeln beider Isomere. B-D: Spektrenausschnitte zur Illustration der Signalverdoppelung in der lichtexponierten Probe. E: chemische Verschiebung und Kopplungskonstante der Protonen an der Doppelbindung von E-KuRei300. F: chemische Verschiebung in Richtung Hochfeld und verminderte Kopplungskonstante der Protonen an der Doppelbindung von Z-KuRei300. #: Spektren der frischen Lösung, ☼: Spektren der lichtexponierten Lösung.

$^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie und HPLC übereinstimmen. Die Photoisomerisierung von Chalkonen ist in der Literatur bereits dokumentiert [184]. Interessanterweise fanden Iwata et al., dass das Chalkon Z-3-Hydroxy-3'-methylchalcon die Proliferation von humanen Magenkrebszellen doppelt so effektiv hemmte wie das zugehörige E-Isomer [184]. Welchen Einfluss die Konfiguration der Doppelbindung bei KuRei300 auf die Pharmakodynamik hat, ist bisher nicht bekannt. Es war im Rahmen dieser Arbeit daher unbedingt notwendig, die Photoisomerisierung zu verhindern, um sicherzustellen, dass alle Ergebnisse mit der Originalsubstanz E-KuRei300 erhalten wurden.

### **4.2.3 Suche eines geeigneten Trägersystems**

#### **4.2.3.1 Vorversuche**

##### **Wässrige Tensidlösungen**

Wässrige Lösungen von Polysorbat 20, Polysorbat 80 und Poloxamer 188 verbesserten zwar die Benetzbarkeit, aber kaum die Löslichkeit von KuRei300, wie an der nur sehr zart gelben Farbe der Proben erkennbar war. Lösungen mit Tyloxapol (5%) färbten sich hingegen sehr deutlich gelb. Dieses Tensid wurde allerdings nicht weiter berücksichtigt, weil Recherchen ergaben, dass es zu Hyperlipidämie bei Mäusen führt [185]. Die Poloxamerlösungen waren farblos. Wie bei reinem Wasser auch wurde mittels HPLC kein KuRei300 in den Proben gefunden, was vermutlich an der fehlenden Mizellbildung in diesem Konzentrationsbereich liegt [186].

##### **Fette Öle und $\alpha$ -Tocopherol**

Als Triglyceride wurden MCT, Sonnenblumenöl und Rizinusöl ausgewählt. Zusätzlich wurde  $\alpha$ -Tocopherol als lipophile, aber nicht lipidbasierte Matrix getestet, das ebenfalls in Form von Emulsionen als Wirkstoffträger beforscht wird [74]. MCT und Sonnenblumenöl hatten ein mäßiges Lösevermögen (beide etwa 0,5 mg/ml), Rizinusöl und  $\alpha$ -Tocopherol waren vollkommen ungeeignet.

KuRei300 verhielt sich den Versuchen zu Folge ausgesprochen hydrophob und profitierte mit Ausnahme von Tyloxapol nicht durch den Zusatz von Tensiden zu Wasser. Trotz des hohen theoretischen logP war die Substanz auch nur moderat löslich in den fetten Ölen. Obwohl ein hoher logP im Allgemeinen mit einer niedrigen intrinsischen Wasserlöslichkeit in Zusammenhang gebracht wird, ist er allein kein hinreichender Deskriptor für das Löslichkeitsverhalten. Chu und Yalkowsky verbesserten die Löslichkeitsvorhersagen für einen Satz von wirkstoffartigen Verbindungen [187], indem sie nicht nur den logP, sondern auch den Schmelzpunkt einbezogen (Allgemeine Löslichkeitsgleichung) [188]. Der Schmelzpunkt spiegelt die intermolekularen Wechselwirkungen kristalliner Substanzen innerhalb des Kristallgitters wider, die während des Lösungsvorgangs überwunden werden müssen. Das gilt selbstverständlich auch für lipophile Lösungsmittel [189]. Im Hinblick auf die

mit 274°C angegebene Zersetzungstemperatur von KuRei300 (4.2.2) ist die mäßige Löslichkeit in den fetten Ölen somit nicht völlig überraschend.

Da dennoch eine gewisse Lipophilie von KuRei300 vorhanden war, wurde es für sinnvoll erachtet, lipidbasierte kolloidale Trägersysteme in die Beladungsexperimente mit einzubeziehen.

### 4.2.3.2 Trägersysteme

#### 2-HP-β-CD-Lösung

In der 2-HP-β-CD-Lösung war nach der Inkubation mit KuRei300 keinerlei Signal mit der HPLC detektierbar. Das untersuchte Cyclodextrin scheint also keine Einschlussverbindung mit KuRei300 einzugehen und kam somit als Trägersystem nicht in Frage.

#### Lipidbasierte kolloidale Dispersionen

Als lipidbasierte kolloidale Dispersionen wurden Liposomen, Mischmizellen, unterkühlt-smektische Nanopartikel, kubische Nanopartikel und die Lipidnanoemulsion Lipofundin® MCT 20 % untersucht. Alle genannten Systeme sind entweder bereits für die parenterale Anwendung zugelassen (Lipofundin® MCT) oder werden im Hinblick auf ihre Eignung als nanopartikuläre Wirkstoffträgersysteme evaluiert. Tabelle 4-2 gibt die wichtigsten Bestandteile sowie die Partikelgrößencharakteristika der verwendeten Dispersionen an.

Die Trägersysteme wurden mit KuRei300-Beschichtungen inkubiert (THF/ 2,7 mbar) und der Wirkstoffgehalt anschließend UV-spektrometrisch quantifiziert. Bei den unterkühlt-smektischen Nanopartikeln und den kubischen Nanopartikeln waren nach der Filtration noch wenige einzelne, winzigste Kristalle unter dem Mikroskop sichtbar.

Im Vergleich zu Wasser, bei dem überhaupt kein KuRei300 in Lösung nachgewiesen werden konnte, verbesserten alle Trägersysteme die Löslichkeit (Abbildung 4-7 links). Die

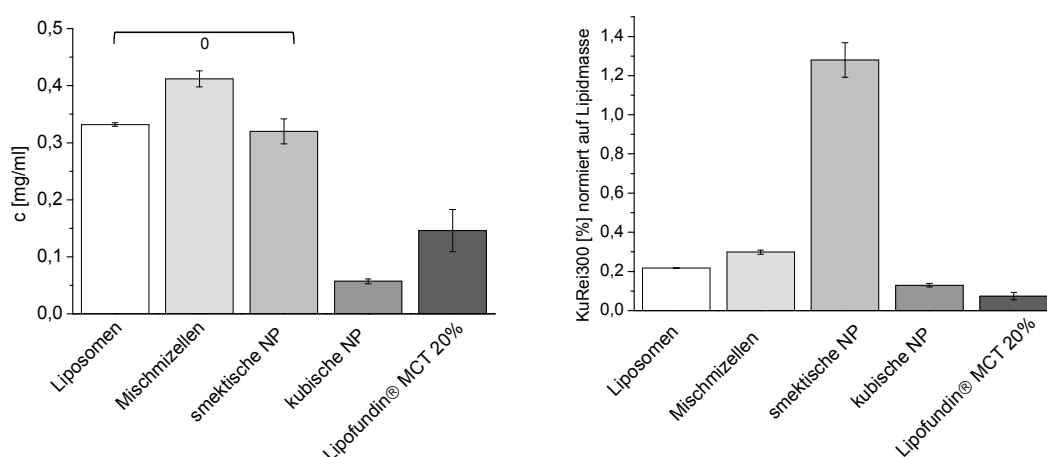
**Tabelle 4-2:** Wichtigste Bestandteile und Partikelgrößencharakteristika der für die Formulierung von KuRei300 getesteten lipidbasierten kolloidalen Systeme.

Trägersystem	Lipid [%]	Tensid [%]	z-Av/ Pdl
Liposomen	Lipoid® S100 [15 %]	-	116 nm/ 0,13 <sup>a</sup> 100 nm/ 0,06 <sup>b</sup>
Mischmizellen	Lipoid® S100 [13,4 %]	Natriumglycocholat- Hydrat [7,4 %]	-
u-sm Nanopartikel <sup>c</sup>	Cholesterylmyristat [2,5 %]	Poloxamer 188 [2 %]	131 nm/ 0,13
kubische Nanopartikel	Monoolein [4,4 %]	Poloxamer 407 [0,6 %]	355 nm/ 0,10
Lipofundin® MCT 20 %	Sojabohnenöl [10 %] MCT [10 %]	Eilecithin [1,2 %] Natriumoleat [nicht spezifiziert]	287 nm/ 0,15

u-sm: unterkühlt-smektisch; z-Av: Z-Average-Durchmesser; Pdl: Polydispersitätsindex

<sup>a</sup>Hergestellt durch manuelle Extrusion. <sup>b</sup>Hergestellt durch maschinelle Extrusion. <sup>c</sup>Zusammensetzung könnte durch Homogenisationsprozess geringfügig verändert worden sein.

Solubilisationskapazitäten hingen entscheidend von der Art und der Konzentration der kolloidalen Lipidmatrix in den Dispersionen ab. Von den eingesetzten Trägersystemen enthielten Mischmizellen (0,41 mg/ml) und Liposomen (0,33 mg/ml) die höchsten Konzentrationen an KuRei300. Auch die unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristatpartikel erzielten eine nennenswerte Beladung (0,32 mg/ml). Die kubischen Nanopartikel (0,06 mg/ml) und Lipofundin® MCT Emulsion (0,15 mg/ml) zeigten die schlechtesten Ergebnisse, obwohl letztere mit 20 % den höchsten Lipidmatrixanteil enthält. Wenn die Wirkstoffkonzentration auf die Lipidmasse normiert wird, stellt sich die Situation anders dar (Abbildung 4-7 rechts). Da der Lipidgehalt in den Zubereitungen weder nach der Herstellung noch nach der Filtration quantifiziert wurde, bezog sich die Berechnung auf die nominalen Lipidmengen in den jeweiligen Rezepturen. Die unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristatpartikel solubilisierten mit Abstand die größte Menge KuRei300 gefolgt von den Mischmizellen und den Liposomen. Die Lipofundin® MCT Emulsion schnitt erneut außergewöhnlich schlecht ab und die kubischen Nanopartikel nur wenig besser. Offensichtlich waren das Monoglycerid (Monoolein) und noch ausgeprägter die Triglyceride (Sojaöl, MCT) nur schlecht in der Lage, mit KuRei300 zu interagieren. Das polarere Phosphatidylcholin stellte sich als geeigneteres "Lösungslipid" heraus. Hier wiederum schien die Mischmizellformulierung mit dem Gallensalz die Interkalierung mit dem KuRei300-Molekül besser zu ermöglichen als die reine Phospholipiddoppelschicht der Liposomen. Polarität ist jedoch vermutlich nicht der einzige bestimmende Faktor für das Solubilisationsvermögen, wie auch das hervorragende Abschneiden von Cholesterylmyristat zeigt. Dieser Cholesterol ester der Tetradeconsäure ist weniger polar als Phosphatidylcholin [106], solubilisierte aber fünf Mal mehr KuRei300. Daher scheint auch die Größe und die



**Abbildung 4-7:** UV-spektrometrisch bestimmte Beladung verschiedener Dispersionen mit KuRei300. Links: Konzentration bezogen auf die wasserhaltigen Zubereitungen. Rechts: Konzentration (m/m) normiert auf den Gehalt des Matrixlipids in den Dispersionen. Jedes Experiment wurde doppelt durchgeführt und jede Probe doppelt für die Quantifizierung aufbereitet (n=4). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Mit Ausnahme der mit „0“ markierten Balken unterscheiden sich alle Werte statistisch signifikant voneinander.

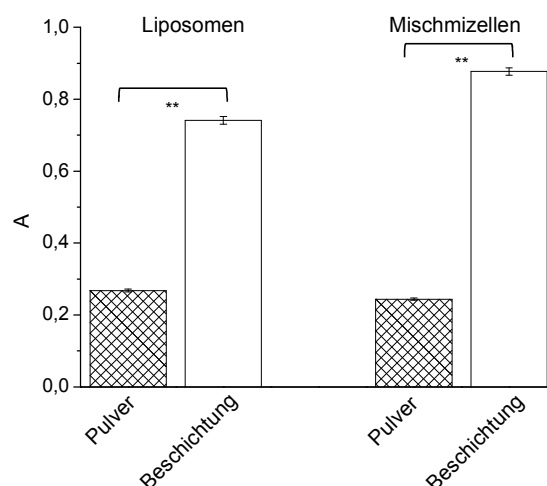


Organisation (kubische Struktur, unterkühlt-smektischer Zustand, Doppelschicht, Flüssigkeit) des beteiligten Lipidträgers eine wichtige Rolle zu spielen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die passive Beladung aller lipidbasierten kolloidalen Trägersysteme mit KuRei300 gelang, aber selbst bei den besten die erreichte Konzentration eher moderat war. Weder die Zielkonzentration von 10 mg/ml für den intravenösen noch von 2 mg/ml für den intraperitonealen Applikationsweg konnten erreicht werden. Insbesondere die unterkühlt-smektischen Cholesterylmyristatpartikel hätten bei Einsatz eines höheren Lipidanteils in der Dispersion vermutlich noch Potential für eine höhere Beladung. Dem wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter nachgegangen, weil für die *In-vivo*-Studien aus verschiedenen Gründen die mischmizellare Zubereitung ausgewählt wurde (siehe 4.2.7).

#### 4.2.4 Einfluss des physikochemischen Zustands von KuRei300 auf die Höhe der Beladung

Während diverser Beladungsexperimente fiel auf, dass die erzielbare Konzentration an KuRei300 deutlich höher zu sein schien, wenn Beschichtungen an Stelle des Substanzpulvers eingesetzt wurden. Ursprünglich waren die Beschichtungen nur entwickelt worden, um Filtrationsschwierigkeiten im Rahmen der passiven Beladung zu umgehen. Die beschriebene Beobachtung wurde an zwei Trägersystemen nochmals systematisch untersucht. Dazu wurden Mischmizellen und Liposomen jeweils mit KuRei300-Pulver oder einer Beschichtung (THF/2,67 bar) inkubiert und die resultierende Beladung UV-spektrometrisch bestimmt.



**Abbildung 4-8:** Erzielbare Beladung von Liposomen und Mischmizellen mit KuRei300 in Abhängigkeit davon, ob das unveränderte Pulver oder Beschichtungen (THF/2,67 bar) bei der Inkubation eingesetzt wurden. Die dargestellte UV-Absorption A der Proben ist ein Maß für die Konzentration von KuRei300. Jedes Experiment wurde doppelt durchgeführt und jede Probe doppelt für die Quantifizierung aufbereitet (n=4). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Werte von Pulver und Beschichtung unterscheiden sich hochsignifikant (\*\*).

Die Inkubation mit den Beschichtungen führte zu Beladungsmengen, die dreimal so hoch waren wie die, die mit dem unverarbeiteten Pulver erzielt wurden (Abbildung 4-8). Die Vermutung lag daher nahe, dass KuRei300 in den Beschichtungen seinen physikalischen Zustand verändert hat. Aus dem Bereich der Sprühtrocknung, bei der unter anderem wässrige oder wässrig-organische Lösungen von Wirk- und/oder Hilfsstoffen rasch verdampft werden, sind solche physikochemischen Veränderungen der Ausgangssubstanzen bekannt [176,177]. Analog dazu könnte KuRei300 während des Herstellungsprozesses einer Beschichtung in eine andere Modifikation oder den (teil)amorphen Zustand überführt worden sein.

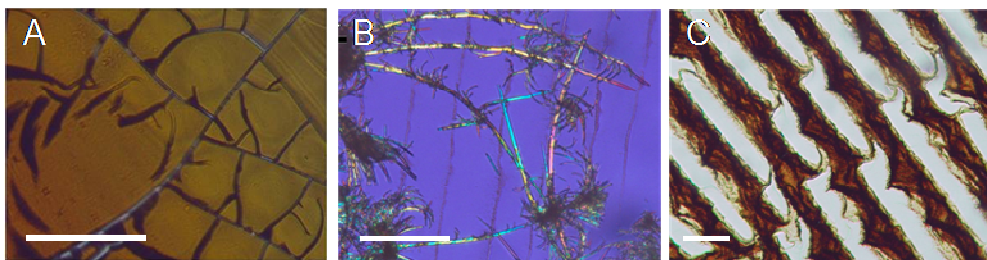
### **4.2.5 Charakterisierung des physikalischen Zustands der Beschichtungen**

Um die Ursache für die Beladungsunterschiede aufzuklären, wurden die Bedingungen bei der Herstellung der Beschichtungen genauer betrachtet und die resultierenden Eigenschaften der Beschichtungen mit denen des KuRei300-Pulvers verglichen. Für die Herstellung der Beschichtungen wurde KuRei300 in THF oder Ethanol gelöst und die Lösungsmittel anschließend bei 2,7 mbar oder 26,7 mbar verdampft. Direkt im Anschluss wurden die Beschichtungen polarisationsmikroskopisch begutachtet und innerhalb von 24 h WAX-Diffraktogramme aufgenommen. Ergänzend wurden Thermogramme aufgezeichnet und das Verhalten der Proben mittels Heitzischmikroskopie verfolgt.

#### **4.2.5.1 Parameter bei der Beschichtungsherstellung**

Die Verwendung der Vakuumzentrifuge ermöglichte deutlich kontrolliertere Verdampfungsbedingungen als der zu Beginn der Arbeit verwendete Abzug (vergleiche 4.1.2). Leider ließ sich die Temperatur in der Zentrifuge allerdings erst ab 45°C aufwärts regeln, so dass darauf verzichtet wurde. Die Prozesstemperatur hing deshalb von Typ und Volumen des Lösungsmittels sowie vom Unterdruck in der Zentrifuge ab. Auch die Umdrehungszahl war weder einstellbar noch angegeben.

KuRei300-Lösungen aus THF führten stets zu bernsteinfarbenen, lackartigen Beschichtungen unabhängig von der Höhe des Unterdrucks und dem Gesamtvolumen des Lösungsmittels in der Zentrifuge (Abbildung 4-9 A). Das deutet darauf hin, dass Verdampfungsgeschwindigkeit und Temperatur in diesem Fall keine besonders kritischen Parameter darstellten. Im Gegensatz dazu waren die Beschichtungen aus ethanolischen Lösungen äußerst empfindlich in der Herstellung und die Temperatur spielte eine entscheidende Rolle. Bei einem Unterdruck von 2,67 mbar kühlte die Rotorkammer im Laufe der Verdampfung auf unter 0°C ab. Als Folge der reduzierten Löslichkeit von KuRei300 im kalten Ethanol enthielt die Beschichtung sowohl Kristalle als auch charakteristische sanddünenartige Strukturen (Abbildung 4-9 B). Betrug der Unterdruck nur 26,7 mbar, verdampfte das Ethanol langsamer und der Temperaturabfall war nicht so ausgeprägt. Es



**Abbildung 4-9:** Habitus der KuRei300-Beschichtungen in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und dem Verdampfungsdruck. Es wurden polarisationsmikroskopische Bilder der Beschichtungen direkt durch die Wand der Injektionsgefäße aufgenommen. A: THF/2,67 mbar; B: Ethanol/2,67 mbar; C: Ethanol/26,7 mbar. Der Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

wurden nur noch sanddünenartige Strukturen, aber keine Kristalle mehr beobachtet (Abbildung 4-9 C). Die Bildung dieser Beschichtungen war sehr störanfällig. Selbst ein kurzes Entnehmen der Injektionsgefäße aus dem Rotor zur Prüfung auf sichtbare Ethanolreste rief Kristallwachstum hervor. Um die Bildung von Kristallen zu vermeiden, durften die Injektionsgefäße bis zum vollständigen Verdampfen des Ethanols nicht berührt werden.

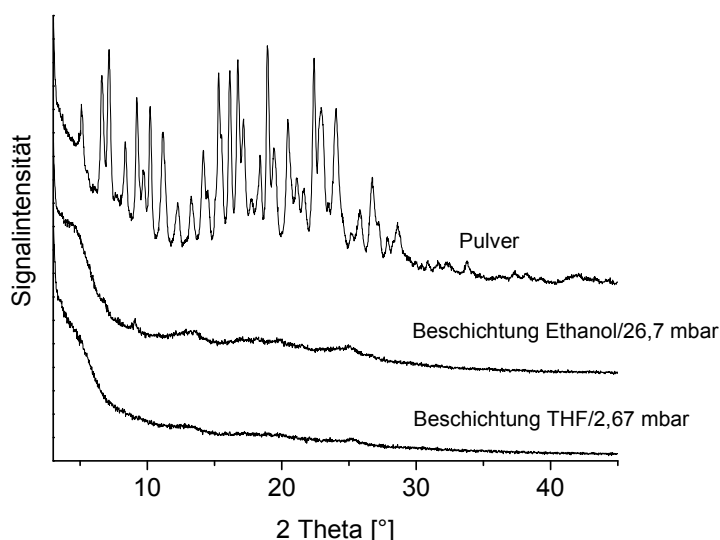
#### 4.2.5.2 WAXD

Die Diffraktogramme der Beschichtungen und des unbehandelten KuRei300-Pulvers unterschieden sich stark. Wie für kristalline Substanzen typisch zeigte das Diffraktogramm des Pulvers eine große Zahl scharfer Reflexe. Für die Beschichtungen aus THF und Ethanol traten nur sehr wenige und breite Signale auf (Abbildung 4-10). Offensichtlich reduzierte die Verarbeitung von KuRei300 zu Beschichtungen dessen Kristallinität beträchtlich. Dass die rasche Trocknung von Wirkstofflösungen dazu führen kann, dass die entsprechenden Wirkstoffe in einem veränderten physikalischen Zustand anfallen, ist aus dem Gebiet der Sprühtrocknung hinlänglich bekannt [176,177,190].

#### 4.2.5.3 DSC und Heitzschmikroskopie

##### KuRei300-Pulver

Das Thermogramm für das KuRei300-Pulver zeigte bei etwa 240°C ein kleines, klares endothermes Ereignis (Abbildung 4-11 A). Dieses deckte sich mit dem Wachstum von langen, spitzen Nadeln, das unter dem Polarisationsmikroskop zu beobachten war (Abbildung 4-11 B, 237°C). Da während dieses Prozesse kein Schmelzen sichtbar war, ist eine fest-fest-Phasenumwandlung [191,192] zu vermuten. Wurde die Probe nach Bildung der mutmaßlichen neuen Modifikation abgekühlt, so blieb diese stabil. Beim weiteren Heizen zeigte sich ein ausgeprägter endothermer Peak bei etwa 312°C (Abbildung 4-11 A) und anschließend zersetzte sich die Substanz. Diese Effekte spiegelten sich im Schmelzen der



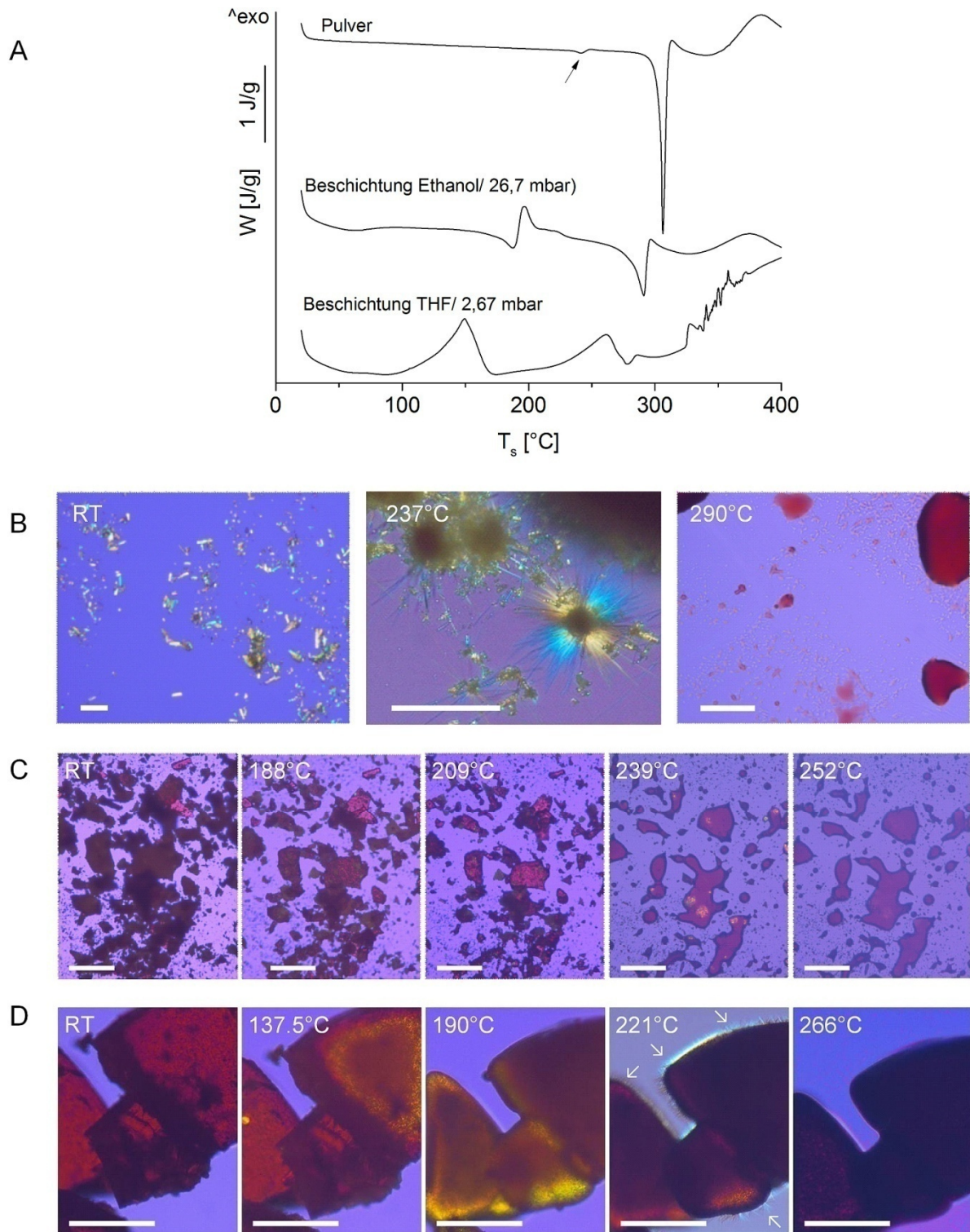
**Abbildung 4-10:** WAX-Diffraktogramme von KuRei300 in Form des Pulvers und verschiedener Beschichtungen.

Nadeln ab 290°C (Abbildung 4-11 B, 290°C) und dem anschließenden Schwarzfärben der Schmelze wider.

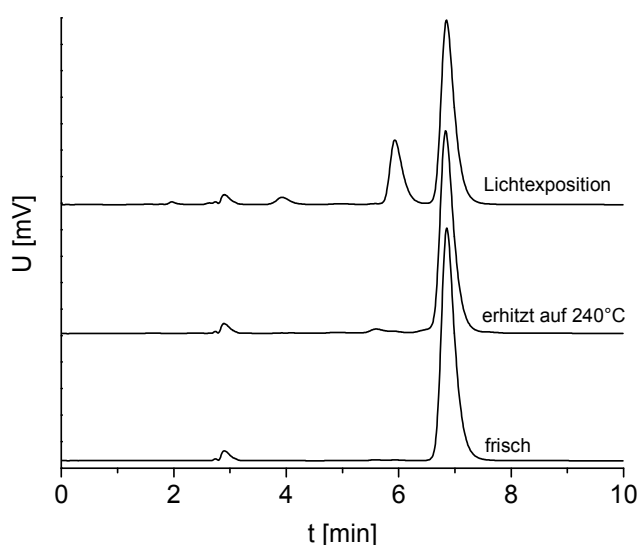
Im Zusammenhang mit der nachgewiesenen Isomerisierung von KuRei300 (4.2.2.2) war zu klären, ob sich bei 237°C tatsächlich eine neue Modifikation bildet oder ob es sich möglicherweise um eine thermotrope Isomerisierung handelt. Dazu wurde KuRei300-Pulver auf dem beheizbaren Objektträger drei Minuten auf 240°C erhitzt und so gezielt in die fragliche Form überführt. Die Umwandlung wurde mikroskopisch überprüft. Anschließend wurde die Substanz mittels HPLC-UV mit dem unbehandelten Pulver und einer lichtexponierten Probe (DMSO-Lösung, 12 Tage alt) verglichen. Das Chromatogramm der erhitzten Probe zeigte kein Signal bei der Retentionszeit für Z-KuRei300 (Abbildung 4-12). Demzufolge handelt es sich bei dem endothermen Ereignis tatsächlich um einen polymorphen Übergang und nicht um eine temperaturvermittelte Isomerisierung.

#### **Beschichtung aus Ethanol (26,7 mbar)**

Bei der Beschichtung aus Ethanol (26,7 mbar) begann bei etwa 150°C ein endothermer Prozess mit anschließendem Peak bei 187°C (Abbildung 4-11, A). Ab dieser Temperatur fing die dunkle, opake Probe an durchscheinender zu werden und sich im polarisierten Licht pink zu färben (Abbildung 4-11, C 188°C). Im Thermogramm zeigte sich dann ein exothermes Ereignis mit einem Peak bei 194°C. Dieser Peak war von einer Schulter gefolgt und ging in einen weiteren endothermen Prozess mit einem Peak bei 290°C (Abbildung 4-11 A) über. Der letzte Teil des Thermogramms war zwar zu etwas niedrigeren Temperaturen verschoben, sah vom Prinzip her aber aus wie der des KuRei300-Pulvers. Unter dem Mikroskop verlor die Probe bei etwa 209°C (Abbildung 4-11 C, 209°C) an Kontur und schmolz anschließend. In



**Abbildung 4-11:** A: Thermogramme von KuRei300 in Form des Pulvers und verschiedener Beschichtungen. Der Pfeil markiert eine polymorphe Umwandlung. B – C: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen von KuRei300 bei verschiedenen Temperaturen. B: Pulver; C: Beschichtung (Ethanol/26,7 mbar); D: Beschichtung (THF/2,6 mbar). Die Pfeile kennzeichnen kaktusartige Nadelstrukturen. Der Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ . RT: Raumtemperatur.



**Abbildung 4-12:** HPLC-Chromatogramme von unterschiedlich vorbehandeltem KuRei300. Oben: lichtexponierte DMSO-Lösung, Mitte: Pulver nach Hitzebehandlung, unten: unbehandeltes Pulver. Alle Proben waren in DMSO gelöst.

der Schmelze entwickelten sich helle, kristalline Bereiche (Abbildung 4-11 C, 239°C), die sich ausbreiteten und bei etwa 252°C (Abbildung 4-11 C, 252°C) erneut schmolzen. Das Probenbild wurde dann dunstig und es entwickelte sich ein brenzlicher Geruch.

#### Beschichtung aus THF (2,67 mbar)

Das Thermogramm zeigte ein breites exothermes Ereignis mit einem Peak bei etwa 150°C (Abbildung 4-11 A), das einer Kaltkristallisation (d.h. nicht aus einer Schmelze) aus der (nahezu) amorphen Substanz zugeschrieben werden kann. Die bernsteinfarbene Beschichtung intensivierte ihre Farbe zu einem hellen Orange ab etwa 129°C und kristalline Strukturen wurden innerhalb der Substanzpartikel sichtbar (Abbildung 4-11 D, 137,5°C). Es folgte ein zweites exothermes Ereignis mit einem Peak bei etwa 260°C. Der Beginn war von einer flachen Schulter begleitet, die ein endothermes Ereignis maskiert haben könnte (Abbildung 4-11 A). Mikroskopisch war zu beobachten, dass sich bei 190°C die Konturen der Partikel etwas aufweichten, ohne jedoch die Form zu verlieren (Abbildung 4-11 D, 190°C). Ab 201°C wurden die Konturen wieder schärfer und es bildeten sich winzige kaktusartige Nadeln (Abbildung 4-11 D, 221°C). Sie verschwanden ab 260°C und die Substanz färbte sich ohne erkennbares Schmelzen schwarz (Abbildung 4-11 D, 266°C). Oberhalb von 300°C wies auch das Thermogramm auf Zersetzung hin (Abbildung 4-11 A).

Die physikochemische Charakterisierung ergab, dass die Verbesserung der Löslichkeit durch Beladung aus KuRei300-Beschichtungen an Stelle des unbehandelten Pulvers durch eine wesentliche Reduktion der Kristallinität bedingt ist. Der Einsatz der Beschichtungen war somit entscheidend für die Höhe der Beladung, die mit den Trägersystemen erzielt werden

konnte. Eine lückenlose Interpretation der Ergebnisse aus DSC und Heitzschmikroskopie für die Beschichtungen war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Offensichtlich fanden mehrere Prozesse gleichzeitig statt und führten zu überlagerten Signalen. Es kann jedoch mit Sicherheit gesagt werden, dass KuRei300 mindestens zwei kristalline Modifikationen und den amorphen Zustand unter den untersuchten Bedingungen ausbildete. Um das polymorphe Verhalten vollständig aufzuklären, wären umfangreichere Untersuchungen unter stärker kontrollierten Bedingungen (Zentrifuge mit Temperaturkontrolle) und Anwendung zusätzlicher Techniken (z.B. IR-Spektroskopie, Thermogravimetrie) notwendig gewesen. Insgesamt macht das deutlich, dass wenn möglich bei der passiven Beladung auf Beschichtungen verzichtet werden sollte, weil ihre physikochemische Charakterisierung einen Aufwand an Substanzmaterial und Zeit bedeutet.

Es ist zu beachten, dass der nahezu amorphe Zustand von KuRei300 in den Beschichtungen nicht der thermodynamisch stabilste ist. Bei einem amorphem Wirkstoff besteht prinzipiell die Gefahr, dass er sich bei Inkontaktbringen mit einem wässrigen Medium in eine kristalline, thermodynamisch stabilere Form umgewandelt. Ebenso kann er kristallin aus der übersättigten Lösung, auch zeitverzögert, ausfallen. Beides kann unter Umständen durch Zugabe von Polymeren wie Cellulosederivaten oder Polyvinylpyrrolidon verhindert werden [193,194]. Ein prominentes Beispiel für Herausforderungen, die sich bei der Formulierung von thermodynamisch nicht stabilen Substanzformen ergeben können, ist Ritonavir. In diesem Fall war die Herstellung der Darreichungsformen auf die Verarbeitung einer relativ gut löslichen Modifikation ausgerichtet. Als sich große Mengen der Bulkware und der Substanz in fertigen Zubereitungen sehr unerwartet in eine schlechter lösliche Modifikation umwandelten, führte dies zu weitreichenden Auflösungs- und Löslichkeitsproblemen [195]. Bei festen Dispersionen wird Übersättigung gezielt eingesetzt. Einerseits kann der Wirkstoff in der festen Dispersion bereits übersättigt vorliegen, andererseits kann sich nach Auflösen der Einbettungsmatrix im Gastrointestinaltrakt eine übersättigte Lösung bilden [17].

#### **4.2.6 Einfluss der Beschichtung auf die Beladungsgeschwindigkeit**

Es wurde bereits dargelegt, dass die nahezu amorphe Form von KuRei300 (Beschichtung Ethanol/ 26,7 mbar) zu einer deutlich höheren Beladung führt als die kristalline Ausgangssubstanz. Die höhere Löslichkeit von amorphen Wirkstoffen im Vergleich zu kristallinen Modifikationen ist in der Literatur gut dokumentiert [196,197]. Im amorphen Zustand ist der Vorgang des Auflösens dadurch erleichtert, dass keine Gitterenergie überwunden werden muss. Neben der Löslichkeit kann auch die Auflösungsgeschwindigkeit erhöht sein. Es sollte überprüft werden, inwiefern das für die passive Beladung mit KuRei300 zutrifft. Zu diesem Zweck wurden Beschichtungen aus Ethanol unter drei unterschiedlichen Verdampfungsbedingungen erzeugt: Abzug (unter Lichtabschirmung), 26,7 mbar sowie

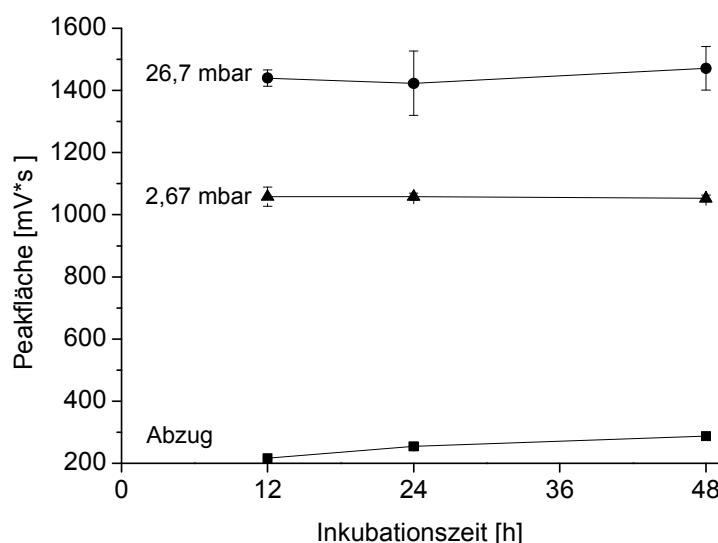
2,67 mbar. Alle Beschichtungen wurden mit Mischmizellen inkubiert und der Gehalt von KuRei300 nach 12, 24 und 48 Stunden mittels HPLC als Peakfläche bestimmt.

Lediglich bei der unter dem Abzug erzeugten Beschichtung stieg der Gehalt von KuRei300 in den Mischmizellen mit zunehmender Länge der untersuchten Inkubationsdauern an. Bei den beiden anderen Beschichtungen war offenbar die maximale Beladung nach 12 Stunden bereits erreicht (Abbildung 4-13). Die Höhe der Beladung unterschied sich deutlich und nahm in der Reihenfolge Abzug, 2,67 mbar, 26,7 mbar zu. Offensichtlich führt das Verdampfen unter dem Abzug zu einer Modifikation, die nicht nur die mit Abstand schlechteste Löslichkeit, sondern auch die langsamste Beladungsgeschwindigkeit in den Mischmizellen hat. Die Teilkristallinität (siehe 4.2.5) der Zentrifugenbeschichtung 2,67 mbar führt zwar zu einer schlechteren Löslichkeit als die nahezu amorphe Zentrifugenbeschichtung 26,7 mbar, aber zumindest im untersuchten Inkubationszeitfenster von 12 Stunden nicht zu Unterschieden in der Beladungsgeschwindigkeit. Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die Zentrifugenbeschichtungen nicht länger als 12 Stunden inkubiert werden müssen.

#### 4.2.7 Auswahl des Trägersysteme für die *In-vivo*-Studien

Alle kolloidalen Trägersysteme blieben mit ihrer Solubilisationskapazität deutlich unter der gesetzten Zielkonzentration für KuRei300 von 2 mg/ml für den intraperitonealen Applikationsweg. Den höchsten Gehalt wiesen die Mischmizellen (0,41 mg/ml), die Liposomen (0,33 mg/ml) und die unterkühlt-smektischen Nanopartikel (0,32 mg/ml) auf.

Als Formulierung für die *In-vivo*-Studien wurden die Mischmizellen ausgewählt. Ausschlaggebenden Punkte waren die höchste Beladung, unkomplizierte Herstellung,



**Abbildung 4-13:** Beladung von Mischmizellen mit KuRei300 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Als Maß für die Beladung ist die Peakfläche von KuRei300 im Chromatogramm angegeben. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n=8$ .



thermodynamische Stabilität und optische Transparenz des Systems. In der hellgelben, durchscheinenden Zubereitung hätte möglicherweise rekristallisierendes KuRei300 leicht bemerkt werden können (Abbildung 4-14). Durch die geringe Größe der Mischmizellen ließ sich die Zubereitung außerdem durch Membranfilter (MF 0,22) filtrieren. Einerseits konnte so die Verwendung von Glasfaserfiltern nach der Inkubation umgangen und damit das Risiko der Übertragung von Glasfaserbruchstücken ins Filtrat ausgeschlossen werden. Andererseits waren keine Zusatzuntersuchungen zur chemischen Stabilität von KuRei300 unter Hitzeeinwirkung notwendig, da die Autoklavierung entfallen konnte. Alle in der mischmizellaren Formulierung enthaltenen Hilfsstoffe sind für die parenterale Anwendung zugelassen und seit den 1990er Jahren befindet sich mit Konakion® MM eine sehr ähnliche Zubereitung für die orale, intramuskuläre und intravenöse Anwendung auf dem Markt [4,100]. Zur Konservierung wurde Thiomersal in einer Konzentration von 0,005% eingesetzt. Im Gegensatz zu Natriumazid ist es ein in Tierarzneimitteln verwendetes Konservierungsmittel. Die Wahl der Konzentration erfolgte in Anlehnung an Angaben in der „Lila Liste“, einer Art „Rote Liste“ für Tierarzneimittel [198]. Zusammenfassend wurde das gewählte Trägersystem als toxikologisch relativ unbedenklich für die Mäuse eingeschätzt.

Da die *Leishmania*-Amastigoten in den Makrophagen des Wirts schmarotzen, würden sich prinzipiell auch Liposomen gut als Trägersystem anbieten. Sie können von Monozyten und Makrophagen aus dem Blutstrom gefiltert werden und sich so in Organen des RES wie Leber und Milz anreichern. Dieser Targetingeffect kann durch gezielte Modifikation der Liposomen bezüglich Größe, Membranzusammensetzung, Ladung und Beschaffenheit der Membranoberfläche noch erhöht werden [199]. Beispielsweise nehmen sogenannte Kupffer-Zellen, Makrophagen der Leber, vorrangig große Liposomen um 500 nm auf [26]. Dass liposomale Zubereitungen antileishmanieller Wirkstoffe wirksamer sind als einfache Lösungen ist schon lange bekannt [136]. Zur Zeit ist mit AmBisome® eine liposomale Amphotericin B-Formulierung für die Therapie der viszeralen Leishmaniose zugelassen [200]. Dieses Produkt wurde jedoch nicht speziell auf Makrophagentargeting ausgerichtet und wird



**Abbildung 4-14:** Mischmizellare Zubereitung mit KuRei300.

hauptsächlich als Antimykotikum eingesetzt [4]. Trotz der vorteilhaften Modifikationsmöglichkeiten für Liposomen wurden sie nicht als Trägersystem für die mit KuRei300 geplanten *In-vivo*-Studien ausgewählt. Die Entwicklung entsprechend großer, möglicherweise geladener und physikalisch und chemisch stabiler Liposomen hätte den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit überschritten.

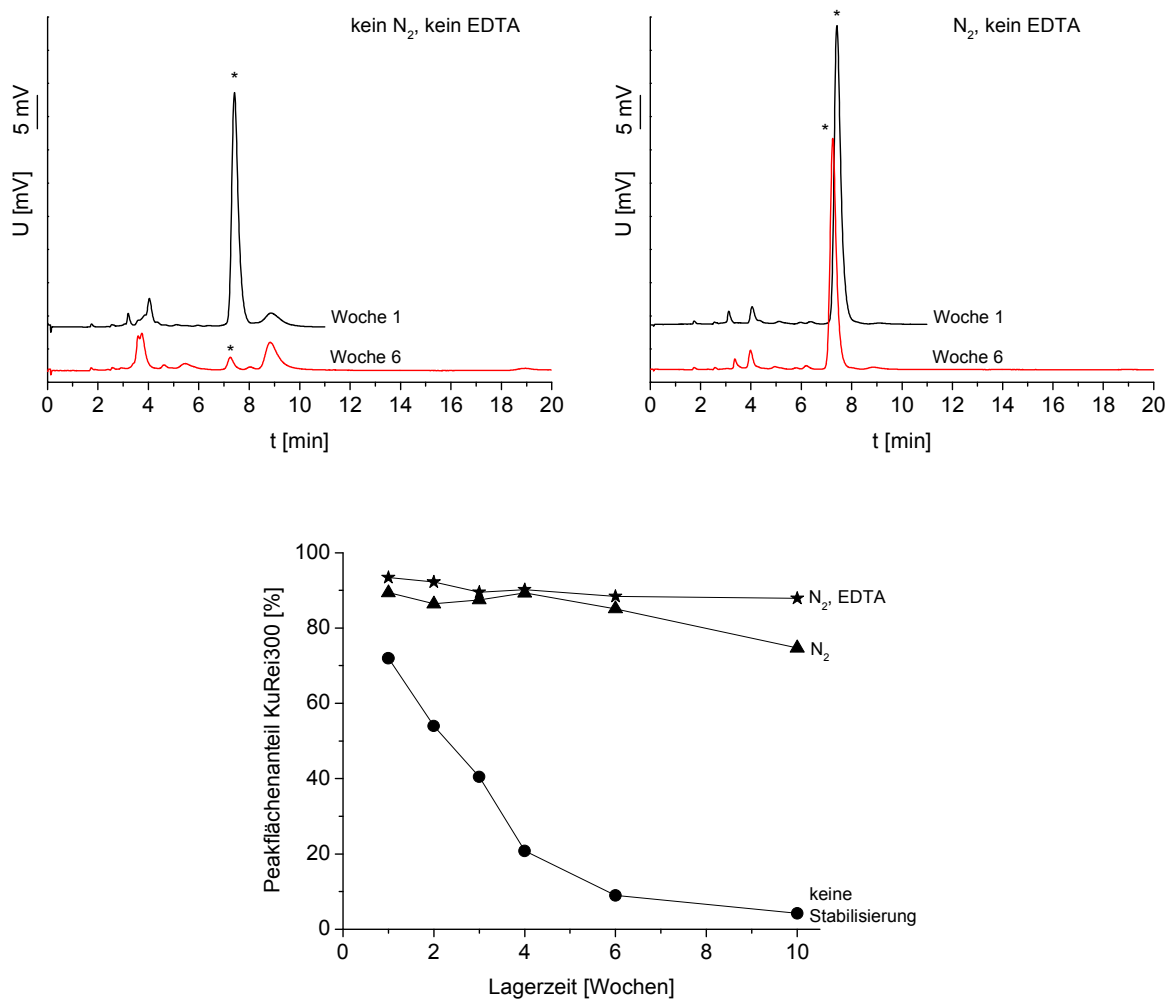
Die unterkühlt-smektischen Nanopartikel hatten ein vergleichbar gutes Solubilisationsvermögen für KuRei300 wie die Liposomen. Leider gibt es zu diesem System noch keine *In-vivo*-Daten, so dass auch von dem Einsatz in den Tierstudien Abstand genommen wurde. Es wäre unbedingt wünschenswert, *In-vivo*-Studien für dieses Trägersystem zu erheben, da es prinzipiell aus physiologischen Komponenten besteht. Bei geeigneter Zusammensetzung und Lagerung sind die Dispersionen auch bei höheren Wirkstoffbeladungen über einen längeren Zeitraum stabil [45].

### 4.2.8 Stabilität der mit KuRei300 beladenen Mischmizellen

#### 4.2.8.1 Chemische Stabilität von KuRei300

Um die chemische Stabilität von KuRei300 zu evaluieren, wurde die mischmizellare Zubereitung mit einer Beschichtung (Ethanol/26,7 bar) beladen. Auf eine Konzentrationsbestimmung wurde verzichtet. Der Ansatz wurde auf drei Injektionsgefäße aufgeteilt und jede Probe unter unterschiedlichen Bedingungen gelagert: a) Zusatz von 0,1 % EDTA in der wässrigen Phase sowie Begasung mit Stickstoff, b) Zusatz von 0,1 % EDTA in der wässrigen Phase und keine Begasung mit Stickstoff, c) weder Zusatz von EDTA noch Begasung mit Stickstoff. Alle Injektionsgefäße wurden bei 20°C unter Lichtausschluss gelagert und nur kurz zur Probenentnahme geöffnet; gegebenenfalls wurde Stickstoff ersetzt. In wöchentlichen Abständen wurde die chemische Stabilität von KuRei300 mittels HPLC überprüft und das Aussehen der Zubereitung unter dem Polarisationsmikroskop beurteilt.

Trotz des strikten Lichtausschlusses unterlag KuRei300 einer raschen Umwandlung in der vollkommen unstabilisierten (kein EDTA, kein Stickstoff) Zubereitung (Abbildung 4-15 oben). Das Erscheinungsbild des Chromatogramms unterschied sich jedoch sehr deutlich von dem der DMSO-Lösung (vergleiche Abbildung 4-5 A). Es gab ein prominentes Signal mit einer Retentionszeit, die höher war als die für KuRei300 sowie diverse sich überlagernde Peaks mit kürzeren Retentionszeiten. Z-KuRei300 war nicht entstanden; es wurde keine Strukturanalyse für die neuen Produkte durchgeführt. Offensichtlich ist KuRei300 anfälliger für chemische Zersetzung, wenn es mit den Mischmizellen assoziiert ist, als wenn es in DMSO-Lösung vorliegt. Hydrolyseprodukte der Phospholipide als Ursache für die neuen Peaks wurden experimentell ausgeschlossen, indem gealterte, unbeladene Mischmizellen ebenfalls chromatographisch untersucht wurden. Das Lagern unter Stickstoff verbesserte die chemische Stabilität deutlich (Abbildung 4-15 unten). Nach vierwöchiger Lagerung betrug der



**Abbildung 4-15:** Oben: Chromatogramme stabilisierter und nicht stabilisierter mit KuRei300 beladener Mischmizellen zu unterschiedlichen Lagerzeitpunkten. Das Sternchen markiert das Signal für KuRei300. Unten: Stabilität von KuRei300 in Mischmizellen in Abhängigkeit von den Stabilitätsmaßnahmen. Alle Proben wurden unter Lichtausschluß bei 20°C gelagert und unterschieden sich durch die Begasung mit Stickstoff (N<sub>2</sub>) und/oder den Zusatz von EDTA. Als Maß für die Stabilität von KuRei300 ist dessen Peakflächenanteil am HPLC-Chromatogramm angegeben.

Peakflächenanteil von KuRei300 statt 21 % noch 89 % (Abbildung 4-15 unten). Ein zusätzlicher positiver Effekt von EDTA war während der ersten sechs Wochen gering ausgeprägt, kam aber nach zehn Wochen zur Geltung. Der Gehalt an KuRei300 war dann 10 % höher als in der lediglich unter Stickstoff gelagerten Probe (Abbildung 4-15 unten).

Mit Hilfe einer schützenden Stickstoffatmosphäre und dem Zusatz von EDTA konnte ein Gehalt von 90 % des ursprünglich eingearbeiteten KuRei300 für den angestrebten Lagerzeitraum von vier Wochen sichergestellt werden. Ein geringer Verlust, der vor allem in den ersten drei Wochen der Lagerung eintrat, war mit den ergriffenen Maßnahmen offenbar nicht zu vermeiden.

#### **4.2.8.2 Physikalische und mikrobiologische Stabilität der Zubereitung**

Auf Grund ihrer thermodynamischen Stabilität zeigten die Mischmizellen erwartungsgemäß keine Instabilität. Sowohl bei 20°C als auch bei Lagerung im Kühlschrank (4-8°C) kristallisierte zudem über den Beobachtungszeitraum von zehn Wochen kein KuRei300 in den Proben aus. Die Rückstellmuster waren auch nach sechs Monaten noch kristallfrei. Da die Beladung mit einer nahezu amorphen Form von KuRei300 vorgenommen wurde, kann allerdings nicht mit völliger Sicherheit ausgeschlossen werden, dass sich unter Umständen eine weniger gut lösliche, kristalline Modifikation bildet und ausfällt. Kristallisationsprozesse sind äußerst komplex und die Bildung kristalliner Nuklei kann durch simple Dinge wie Schütteln, Temperaturreize oder Kratzer im Injektionsgefäß beeinflusst werden [201].

Auf die Kontrolle der mikrobiologischen Qualität wurde verzichtet. Sie wurde als durch den Herstellungsprozess gesichert angesehen.

#### **4.2.9 In-vivo-Studien**

Die für die Tierstudien hergestellte beladene mischmizellare Formulierung enthielt 0,43 mg/ml KuRei300. Die pH-Werte waren 6,7 bei der beladenen Zubereitung und 6,8 im unbeladenen Vehikel. Es wurden jeweils zwei Rückstellmuster unter Lichtausschluss bei 20°C aufbewahrt.

Leider erwiesen sich die Mischmizellen als wesentlich toxischer als erwartet. Tabelle 4-3 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Versuche und die Auswirkungen auf das Überleben der Tiere. Die normalerweise verwendeten Mäuse (BALB/c, 8-9 Wochen alt) verstarben im Laufe eines Tages nach der intraperitonealen Applikation von 1,5 ml der unbeladenen beziehungsweise beladenen Formulierung. Daraufhin wurde zwei gesunden, älteren (Alter nicht spezifiziert) Tieren im Abstand von etwa 24 Stunden jeweils ein reduziertes Volumen von 0,5 ml verabreicht. Weil dies beide Tiere tolerierten, wurden zwei Gruppen infizierter Mäuse mit repräsentativer Gruppenstärke ebenfalls mit 0,5 ml beladener beziehungsweise unbeladener Formulierung behandelt. Wider Erwarten verstarb die überwiegende Anzahl der Tiere. Da beide Gruppen davon betroffen waren, war offensichtlich die mischmizellare Formulierung selbst und nicht etwa eine erhöhte Bioverfügbarkeit des KuRei300 die Ursache für den Tod der Mäuse. Diese, auch aus ethischer Sicht bedauerlichen, Ergebnisse waren nicht zu erwarten gewesen. Obwohl Menschen und Mäuse nur bedingt vergleichbar sind, sind Mäuse etablierte Versuchstiere in der frühen Entwicklungsphase von Wirkstoffen und Medikamenten. Da Konakion® MM ein zugelassene Humanarzneimittel ist, war die Reaktion der Mäuse daher nicht ohne Weiteres abzusehen. Als eventuell toxisches Agens wurde das Konservierungsmittel Thiomersal in Betracht gezogen. Recherchen in der Literatur und bei einem führenden Versuchstierlieferanten (Charles River) ergaben jedoch keine Hinweise darauf, dass BALB/c-Mäuse besonders sensibel darauf reagieren. Trotzdem wurde die

unbeladene Formulierung nochmals ohne Thiomersal an gesunden Mäusen auf Toxizität geprüft. Dabei stellte sich heraus, dass die Tiere erst bei einem reduzierten Volumen von 0,2 ml pro Einzeldosis überlebten. Auch die zu Beginn getestete unbeladene und beladene Zubereitung mit Thiomersal wurde bei Gabe von 0,2 ml vertragen. Nach Ermittlung dieses tolerablen Volumens wurden frische Proben für die eigentlichen Effektivitätsstudien hergestellt und vier Tiergruppen entsprechend 3.2.9 behandelt. Laut Prof. Jaffe wiesen die Leberschnitte der Tiere jedoch darauf hin, dass keine ausreichende Infektion mit *L. donovani* vorlag. Für aussagekräftige Ergebnisse hätten die Versuche daher wiederholt werden müssen. Dies geschah allerdings nicht.

Wegen der unerwarteten Toxizität der mischmizellaren Zubereitung konnten die Effektivitätsstudien nicht wie ursprünglich geplant durchgeführt werden. Als Grund für die Toxizität konnte Thiomersal ausgeschlossen werden. Es war offensichtlich, dass junge Mäuse sensibler auf die Zubereitung reagierten als alte und dass kleine Volumina besser toleriert wurden als große. Möglicherweise war die applizierte Menge des an sich physiologischen Gallensalzes Natriumglycocholat im Verhältnis zur Größe der Tiere zu hoch. Gallensalze können zum einen Zellmembranen durch ihre Detergenzeigenschaften schädigen [202]. Zum anderen werden sie mit der Entstehung von Darmkrebs in Verbindung gebracht, da sie intrazelluläre Signalwege und die Zusammensetzung der Zellmembran von Darmzellen verändern können [203]. Da die Mäuse rasch verstarben, ist eine Art Lyse der Membranen im Bauchraum der Tiere oder/und Hämolyse [204] vorstellbar. Die Autopsie eines verendeten Tieres war vom Kooperationspartner geplant, um Aussagen zur Todesursache treffen zu können. Leider wurden dazu keine Ergebnisse erhalten.

Als weitere Option wären im Rahmen dieser Arbeit (unkonservierte) Liposomen denkbar gewesen. Die Zusammenarbeit wurde von Prof. Jaffe bezüglich neuer Tierversuche allerdings nicht weiter verfolgt.

**Tabelle 4-3:** Resultate der In-vivo-Studien nach intraperitonealer Injektion der entsprechenden Mischmizellformulierungen. Bei doppelter Injektion betrug der Applikationsabstand etwa 24 Stunden. Die Resultate sind in chronologischer Reihenfolge der Versuchsdurchführung aufgelistet.

Anzahl Tiere	Alter	Status	Formulierung	Dosis	Resultat
6	8-9 Wochen	infiziert	beladen	1x 1,5 ml	6/6 tot
1	„alt“	gesund	reines Vehikel	2x 0,5 ml	überlebt
1	„alt“	gesund	beladen	2x 0,5 ml	überlebt
6	8-9 Wochen	infiziert	reines Vehikel	1x 0,5 ml	5/6 tot
6	8-9 Wochen	infiziert	beladen	1x 0,5 ml	5/6 tot
2	8-9 Wochen	gesund	reines Vehikel ohne Thiomersal	1x 0,5 ml	2/2 tot
2	8-9 Wochen	gesund	reines Vehikel ohne Thiomersal	2x 0,2 ml	2/2 überlebt
1	8-9 Wochen	gesund	beladen	2x 0,2 ml	überlebt
1	8-9 Wochen	gesund	reines Vehikel	2x 0,2 ml	überlebt

## **4.3 Lokalisation von Wirkstoffen in lipidbasierten Nanoemulsionen und Nanosuspensionen**

### **4.3.1 Nachteile der spektroskopischen Methoden**

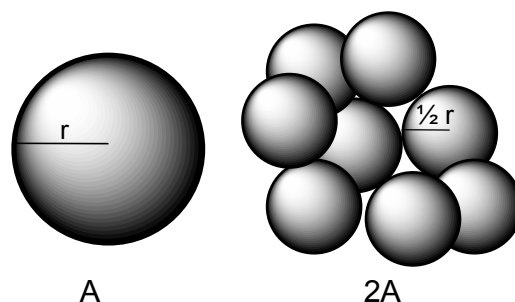
Bisher wurden häufig spektroskopische, technisch anspruchsvolle Methoden eingesetzt, um Erkenntnisse über den Aufenthaltsort von Wirkstoffmolekülen in lipidbasierten Nanoemulsionen und Nanosuspensionen zu gewinnen. Mit  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie und Raman-Spektroskopie lassen sich Aussagen über die Beweglichkeit von Molekülen treffen [9,51,132]. Fluoreszenzspektroskopie gibt Auskunft über die Polarität der Umgebung, in der sich das Markermolekül befindet [51,62,132]. Mit Hilfe der paramagnetischen Resonanzspektroskopie (EPR-Spektroskopie) können Informationen zu beiden Punkten erhalten werden [58,145,146,150]. Ergänzend zur EPR-Spektroskopie wird häufig noch untersucht, ob und wie schnell die untersuchten Moleküle mit Ascorbinsäure reagieren. Die Reduktionsreaktion findet nur statt, wenn sich das Molekül in der wässrigen Phase befindet oder der reaktive Teil zur wässrigen Phase hin ausgerichtet ist. Schließlich werden bei der parelektrischen Spektroskopie Dichte und Mobilität permanenter elektrischer Dipolmomente untersucht [146,149]. Aus den Ergebnissen dieser Methoden, häufig werden zwei oder mehr kombiniert, wird abgeleitet, wo sich der Wirkstoff aufhält. Mit Ausnahme der parelektrischen Spektroskopie sind Experimente unter Nutzung der genannten Techniken auf die Untersuchung von Substanzen beschränkt, die besondere Anforderungen erfüllen. Beispielsweise ist für die Durchführung der EPR-Spektroskopie eine Spinsonde mit einem ungepaarten Elektron Voraussetzung; bei der Fluoreszenzspektroskopie muss ein Fluorophor im Molekül vorhanden sein.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie wiederum liefert nur dann interpretierbare Daten, wenn sich die Signale der Lipidmatrix nicht mit denen des Wirkstoffs überlagern. Folglich werden die meisten Ergebnisse nicht mit pharmazeutisch relevanten Wirkstoffen, sondern mit bloßen Modellsubstanzen erhalten. Insbesondere bei der EPR-Spektroskopie und der Fluoreszenzspektroskopie werden die Markermoleküle zudem in sehr niedrigen Konzentrationen von einigen  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Es ist daher fraglich, in wie weit die so erhaltenen Ergebnisse auf pharmazeutische Zubereitungen übertragen werden können. Ziel dieser Arbeit war, die Lokalisation von Wirkstoffen in lipidbasierten Nanoemulsionen und Nanosuspensionen mit verhältnismäßig schlichten experimentellen Methoden zu untersuchen und zu vergleichen. Für den partikelassoziierten Anteil des Wirkstoffs sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob sich die Moleküle im Inneren des Partikels und/oder in der Grenzfläche aufhalten. Besonderer Wert wurde darauf gelegt, mit tatsächlich pharmazeutisch relevanten Substanzen in realistischen Konzentrationen zu arbeiten und sich nicht auf spezielle Marker- oder Sondenmoleküle zu beschränken. Darüberhinaus sollte

ein Vergleich der Wirkstofflokalisierung, aber auch der Beladungskapazitäten von Emulsionen und Suspensionen mit Systemen erfolgen, die aus den gleichen Komponenten bestehen. In einigen Studien wurden die flüssigen und festen Lipidnanopartikel aus unterschiedlichen Lipidmatrices hergestellt [51,58,146,148]. Weil aber verschiedene Matrices unterschiedlich mit einer Substanz interagieren können, ist der Informationsgehalt dieser Studien möglicherweise eingeschränkt.

### 4.3.2 Arbeitshypothese

In einer vereinfachenden Hypothese wurde davon ausgegangen, dass sich partikelassoziierte Wirkstoffmoleküle entweder an der Oberfläche oder in der Matrix des Partikels aufhalten können. Im ersten Fall würde die erzielbare Beladung mit der Gesamtoberfläche der in der Dispersion vorhandenen Partikel korrelieren, wohingegen im zweiten Fall eine derartige Korrelation nicht zu erwarten wäre. Um diese Annahmen zu überprüfen, könnten zwei Emulsionen verglichen werden, bei denen die Tröpfchen der einen doppelt so groß sind wie die Tröpfchen der anderen. Acht kleine Tröpfchen würden dann zwar die gleiche Masse besitzen wie ein großes, ihre Gesamtoberfläche wäre allerdings doppelt so groß (Abbildung 4-16). Demzufolge würde auch die Beladung mit einer ausschließlich oberflächenassoziierten Substanz in der kleinpartikulären Emulsion doppelt so hoch sein wie in der mit den größeren Tröpfchen. Wenn sich ein Wirkstoff vollständig in der Partikelmatrix aufhalten würde, wäre für die zwei beschriebenen Emulsionen die gleiche Beladung zu erwarten. Die zu bestimmenden Kenngröße für die Prüfung der Arbeitshypothese ist dementsprechend die erzielbare Wirkstoffbeladung pro Lipidmasse.

Der skizzierte mathematische Zusammenhang gilt selbstverständlich nur unter idealisierten Bedingungen, Partikel in realen Dispersionen unterliegen jedoch in der Regel einer gewissen Größenverteilung. Um die aufgestellte Hypothese zu überprüfen und mögliche Beladungsunterschiede herauszuarbeiten, bedurfte es daher besonders gut definierter Nanoemulsionen. In erster Linie sollten sie sich deutlich in der Partikelgröße voneinander unterscheiden und eine enge Partikelgrößenverteilung aufweisen. Darüberhinaus sollte die



**Abbildung 4-16:** Schematische Darstellung der Korrelation zwischen Partikelradius  $r$  und Gesamtoberfläche  $A$  bei kugelförmigen Emulsionspartikeln. Betrachtet werden zwei Partikelpopulationen mit der gleichen Masse an disperser Phase.

wässrige Phase keine zusätzlichen lösungsvermittelnden kolloidalen Strukturen enthalten. Liposomen beispielsweise sind häufig unbeabsichtigte Begleitstrukturen in phospholipidstabilisierten Lipidnanoemulsionen [47], würden aber die gemessenen Werte für die Wirkstoffbeladung an betrachteten Partikeln verfälschen.

Wie bereits erwähnt, sollten im direkten Vergleich mit Nanoemulsionen auch Nanosuspensionen untersucht werden. Es war zu erwarten, dass sich die erzielbare Beladung und die Wirkstofflokalisation bedingt durch den physikalischen Zustand der Partikel unterscheiden. Feste Lipidnanopartikel sind allerdings häufig nicht kugel-, sondern, beispielsweise bei Triglyceriden, plättchenförmig [44,75]. Ein einfacher Zusammenhang zwischen der Partikelgröße und ihrer Oberfläche lässt dann leider nicht so eindeutig herstellen wie für Emulsionen.

### **4.3.3 Wahl der Dispersionssysteme und der Wirkstoffe**

#### **Lipidmatrix**

Weil Lipidnanoemulsionen direkt mit entsprechenden –suspensionen verglichen werden sollten, wurde Trimyristin als Matrixlipid gewählt. Es zählt zu einer Reihe von Triglyceriden, die als Bulkmaterial bei Raumtemperatur fest vorliegen, im nanodispersen Zustand allerdings sogenannte unterkühlte Schmelzen ausbilden können [60,75]. Dementsprechend kann Trimyristin im Zustand der heißen Schmelze durch Hochdruckhomogenisation oder Extrusion zu einer Nanoemulsion verarbeitet werden [9]. Die geringe Größe der kolloidalen Tröpfchen führt dazu, dass die Kristallisationstemperatur etwa 20°C unter die des Bulkmaterials sinkt [75]. Die Nanoemulsionen enthalten folglich bei Raumtemperatur flüssiges Trimyristin im Zustand der unterkühlten Schmelze. Die Emulsionströpfchen verbleiben in diesem Zustand bei genügend warmer Lagerung (beispielsweise bei 20°C), können aber leicht durch vorübergehende Temperaturabsenkung im Kühlschrank zur Kristallisation gebracht werden. Die resultierenden Nanosuspensionen enthalten dann keine kugelförmigen Tröpfchen mehr, sondern flache, kristalline Plättchen [85]. Trimyristin erlaubt somit den direkten Vergleich bestimmter Eigenschaften von Lipidnanoemulsionen und –suspension, die aus identischen Komponenten bestehen [85,205]. Auch im Zusammenhang mit Beladungsstudien wurde diese Vergleichsmöglichkeit bereits genutzt [9,10,62,132].

#### **Emulgator**

Poloxamer 188 wurde als Emulgator gewählt, weil es eine relative hohe kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) besitzt. Selbst bei einer Konzentration von 2,5% (w/v) der ungebundenen Substanz liegt die kritische Mizellbildungstemperatur (CMT) noch bei 46°C [186]. Da die Dispersionen auf einen Gehalt von 1,6% ungebundenen Poloxamers eingestellt wurden, kann bei Raumtemperatur mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass keine Mizellen vorhanden sind.



### Wässrige Phase

Um das System so einfach wie möglich zu halten, enthielt die wässrige Phase außer Wasser und Poloxamer lediglich Thiomersal zur Konservierung.

### Wirkstoffe

In erster Linie wurden die untersuchten Substanzen Amphotericin B, Dibucain, Curcumin, Fenofibrat, Mefenaminsäure, Porphyrin und Propofol nach ihren physikochemischen Eigenschaften ausgewählt. Sie sind alle sehr schwer wasserlöslich und die logP-Werte bewegen sich etwa zwischen 2 und 8 (Tabelle 3-2). MEF und DIBU haben darüberhinaus zwar einen ähnlichen logP ( $\log P_{\text{MEF}} = 4,84$ ;  $\log P_{\text{DIBU}} = 4,76$ ), aber sehr unterschiedliche Löslichkeiten in Wasser ( $L_{\text{MEF}} = 0,0442 \mu\text{g/ml}$ ;  $L_{\text{DIBU}} = 14 \mu\text{g/ml}$ ). Hintergrund dieser Auswahl war, einen möglichen Einfluss der Wasserlöslichkeit auf die passive Beladung beobachten zu können.

Bis auf Porphyrin sind alle Substanzen pharmazeutische Wirkstoffe. Porphyrin ist chemisch dem Wirkstoff Temoporfin allerdings sehr ähnlich (3.1.4.2).

### 4.3.4 Entwicklung der Dispersionen

Für die Untersuchungen zur Wirkstofflokalisation war es eine notwendige Voraussetzung, mit gut definierten Lipidnanodispersionen zu arbeiten. Sie sollten deutlich unterschiedliche Partikelgrößenklassen bei gleichzeitig jeweils enger Partikelgrößenverteilung besitzen. Zunächst wurde als Herstellungsmethode die Prämix-Schmelzextrusion aufgegriffen. Von Joseph et al. waren mit dieser Methode bereits erfolgreich Trimyristin-Poloxamer 188-Nanoemulsionen unter Verwendung von Extrusionsmembranen mit Porendurchmessern von 50, 100 und 200 nm hergestellt worden [61]. Die für die entstandenen Partikel gemessenen  $d_{50}$ -Werte<sup>4</sup> unterschieden sich nicht im gleichen Maß wie die Porendurchmesser [61]. Dennoch wurden die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wiederholt und zusätzlich die Porengröße 400 nm mit einbezogen. Mit allen Membranen ließen sich Emulsionen erzeugen, allerdings enthielten sie stets deutlich sichtbar mikropartikuläres Material. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zur Literatur [61] und konnte trotz sorgfältiger Fehlersuche und häufiger Wiederholung der Herstellung nicht erklärt oder beseitigt werden. Nach Entfernen der Mikropartikel mit Papier- und/oder Glasfaserfiltern (P 4-12 und/oder GF 1,2/ GF 2,7), wurden allerdings Nanoemulsionen mit überzeugenden Partikelgrößen und Pdl's erhalten. Aus diesem Grund wurde dieses pragmatische Vorgehen beibehalten. Ein gewisser Verlust an Lipid musste bei der Filtration hingenommen werden. Bei den Emulsionen mit den größeren Tröpfchen (Membranporengröße 400 nm) war er sehr ausgeprägt und betrug nach groben Schätzungen etwa 60%.

### Parameterstudie

---

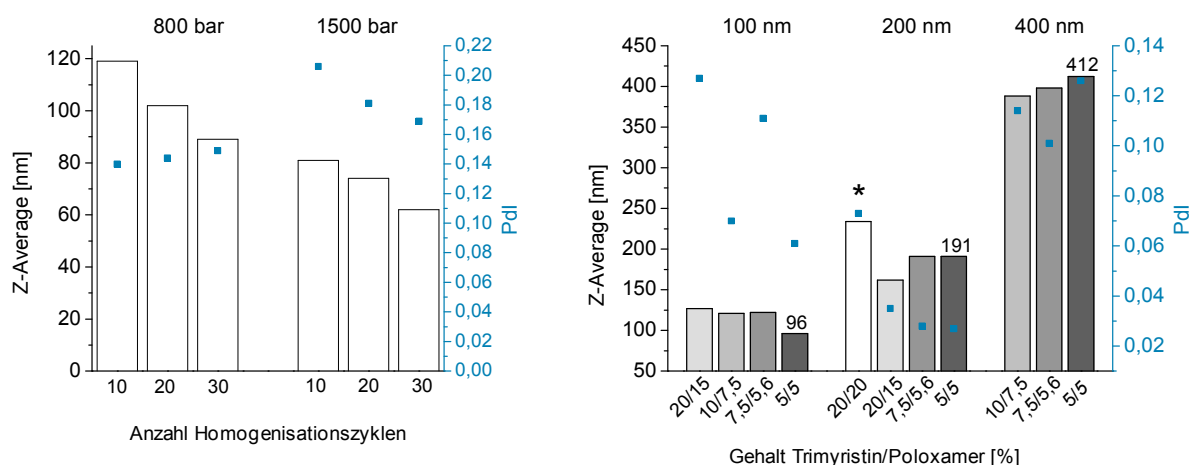
<sup>4</sup> Partikelgrößenparameter, der bei der Laserlichtbeugung erhalten wird.

Um Dispersionen mit möglichst großen Partikelgrößenunterschieden bei gleichzeitig niedrigem Pdl herstellen zu können, wurden Vorversuche durchgeführt. Abgesehen von den variierten Parametern entsprachen die Herstellungsbedingungen den unter 3.2.2 geschilderten. Für den Microfluidizer wurde zudem abweichend eine Dispersion mit 5% Trimyristin und 6% Poloxamer 188 eingesetzt. Jede Emulsion wurde einmal hergestellt. Unter Verwendung des Microfluidizers führen der höchste Druck und die höchste Zyklenzahl eindeutig zu den kleinsten Partikeln. Bei 1500 bar sinkt zudem der Pdl mit zunehmender Zyklenzahl (Abbildung 4-17). Aus diesem Grund wurden 1500 bar und eine Zyklenzahl von 30 als Herstellungsbedingungen für Emulsionen mit kleinstmöglichen Partikeln festgelegt. Bei der Membranextrusion wurde die Partikelgröße im Wesentlichen durch die Porengröße der gewählten Membran vorgegeben. Einen gewissen Einfluss hatten aber auch die Anteile von Trimyristin und Poloxamer 188 in der Dispersion (Abbildung 4-17). Die ausgeprägtesten Partikelgrößenunterschiede bei gleichzeitig akzeptablen Pdl's wurden erzielt, wenn beide Komponenten zu je 5 % enthalten waren.

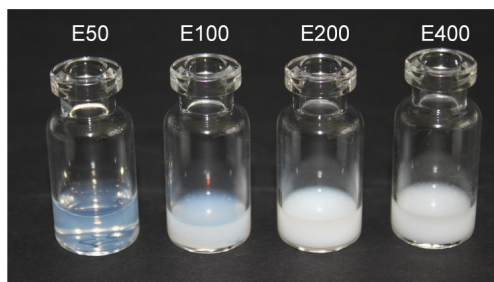
### 4.3.5 Eigenschaften der unbeladenen Dispersionen

#### 4.3.5.1 Aussehen

Einen optischen Eindruck der Emulsionen vermittelt Abbildung 4-18. Obwohl alle Emulsionen den gleichen Lipidgehalt hatten, unterschieden sie sich deutlich in ihrer Transparenz. Besonders ausgeprägt war dieser Unterschied zwischen E50 und E100. E50 war ein halbtransparentes, bläulich schimmerndes System, während E100 zwar im Bereich des Meniskus ebenfalls bläulich schimmerte, aber bereits opak und milchig aussah. E200 und E400 waren mit bloßem Auge nicht mehr voneinander zu unterscheiden und besaßen eine



**Abbildung 4-17:** Partikelcharakterisierung im Zuge der Dispersionsfindung. Links: Hochdruckhomogenisation mit dem Microfluidizer, rechts: Membranextrusion mit dem Avestin. Die mit dem Sternchen (\*) markierte Zubereitung war bei Raumtemperatur gelig. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ohne Standardabweichung angegeben.



**Abbildung 4-18:** Lipidnanoemulsionen mit unterschiedlichen mittleren Partikelgrößen, aber in etwa gleichem Lipidgehalt. Die Kristallisationsenthalpie für Trimyristin wurde mittels DSC auf 1,5 J/g eingestellt.

rein milchweiße Farbe. Die Ursache dieser Farbeindrücke liegt in der unterschiedlichen Streulichtintensität der verschieden großen Teilchen. Die Suspensionen waren auf fotografischen Aufnahmen von den Emulsionen nicht zu unterscheiden. Mit bloßem Auge betrachtet, zeigten sie bei guter Beleuchtung im direkten Vergleich einen minimal anderen Farbton.

Die E400 rahmte nach wenigen Tagen Standzeit deutlich sichtbar auf, ließ sich allerdings durch Schütteln wieder homogenisieren. Analog sedimentierten die kristallinen Partikel in der S400, ließen sich jedoch ebenfalls wieder aufschütteln. Bis auf die TEM-Aufnahmen wurde die Suspension S400 aus der weiteren Charakterisierung ausgeschlossen. Bedingt durch die teilweise sehr langen Partikel war eine Filtration und damit die Durchführung von Beladungsstudien nicht möglich.

#### 4.3.5.2 Physikochemische Charakterisierung und Partikelgrößenbestimmung

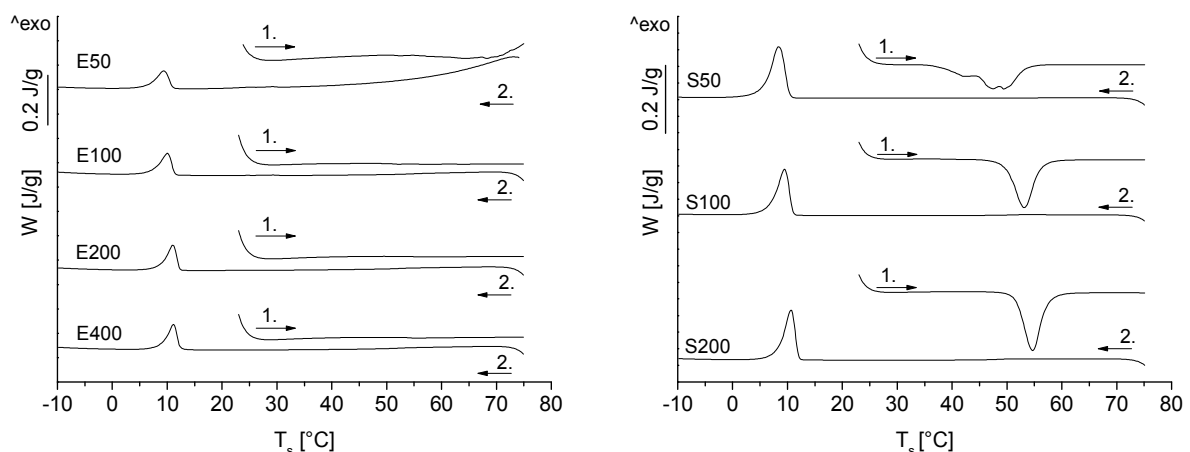
Der physikalische Zustand der unbeladenen Dispersionspartikel wurde vor der Beladung mittels DSC verifiziert. Die Thermogramme der Nanoemulsionen zeigten erwartungsgemäß beim Heizen keinerlei Ereignisse, beim Abkühlen aber exotherme Peaks (Abbildung 4-19 links). Wie in der Literatur bereits beschrieben, unterkühlt Trimyristin als Schmelze in den Tröpfchen. Diese kristallisieren erst bei etwa 10°C im Gegensatz zum Bulkmaterial, das bei ungefähr 30°C kristallisiert [75]. Die Onset-Temperatur  $T_c$  des Kristallisationsereignisses sank leicht mit abnehmender Partikelgröße (E400:  $T_c = 12,4^\circ\text{C}$ , E200:  $T_c = 12,2^\circ\text{C}$ , E100:  $T_c = 11,4^\circ\text{C}$ , und E50:  $T_c = 11,1^\circ\text{C}$ ).

Im Gegensatz dazu zeigten die Thermogramme der Nanosuspensionen Schmelzereignisse in der Heizkurve (Abbildung 4-19 rechts). Mit abnehmender Partikelgröße verbreiterten sich diese Ereignisse und verschoben sich zu niedrigeren Temperaturen. Die Verbreiterung war besonders ausgeprägt bei S50. Der Einfluss der Partikelgröße von Triglyceridnanopartikeln auf ihr Schmelzverhalten ist bereits beschrieben und erklärt worden [81,206]. Kurz gesagt, bildet der stufenartige Schmelzprozess das Schmelzen von kristallinen Lipidpartikeln definierter Plättchenhöhen ab. Die zugehörigen Plättchenhöhen entsprechen jeweils einem

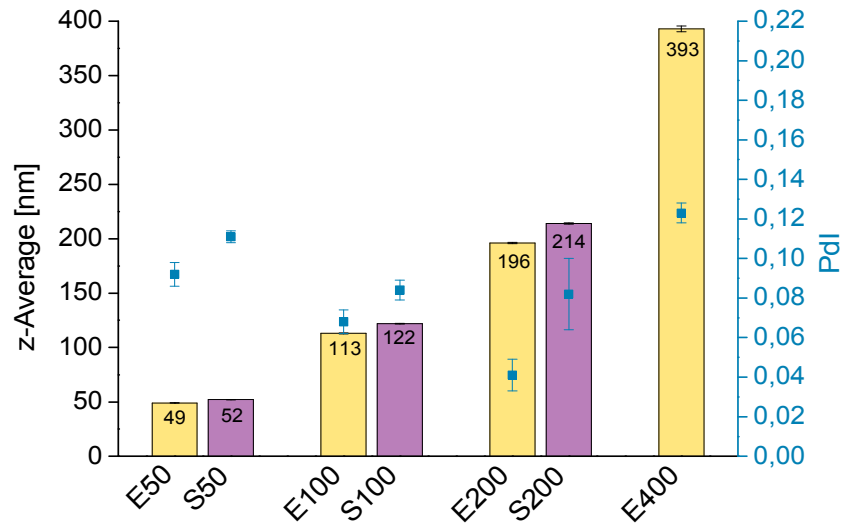
Vielfachen der molekularen Triglyceridschichten, was zu deutlich ausgeprägten Schmelzmaxima führt [81]. Die Kühlkurven der Thermogramme ähnelten wie erwartet denen der Nanoemulsionen (Abbildung 4-19).

Wie angestrebt wiesen die entwickelten Dispersionen ausgeprägt unterschiedliche Partikelgrößen auf (Abbildung 4-20). Die Z-Average-Durchmesser der Suspensionen waren dabei stets ein wenig größer als die der zugehörigen Emulsionen. Das ist – zumindest teilweise – auf die anisometrische, plättchenartige Form der Lipidkristalle in den Suspensionen zurückzuführen [75]. Die TEM-Aufnahmen machen deutlich, dass der Grad der Anisometrie mit der Partikelgröße zunimmt (Abbildung 4-21). Während S50-Partikel nahezu münzartig runde Plättchen waren, dehnten sich die Kristalle zunehmend längs aus, je größer die Partikel der Nanosuspension wurden (Abbildung 4-21). Die PdIs lagen zumeist unter 0,1 und wiesen damit formal auf relativ enge Partikelgrößenverteilungen hin (Abbildung 4-20) [207]. In den TEM-Aufnahmen erscheinen die Partikelpopulationen dennoch recht heterogen. Das unterstreicht, dass für die aussagekräftige Größencharakterisierung von Nanopartikeln neben Laserlichtstreuung oder –beugung eine optische Methode wie die Elektronenmikroskopie sehr sinnvoll ist [208].

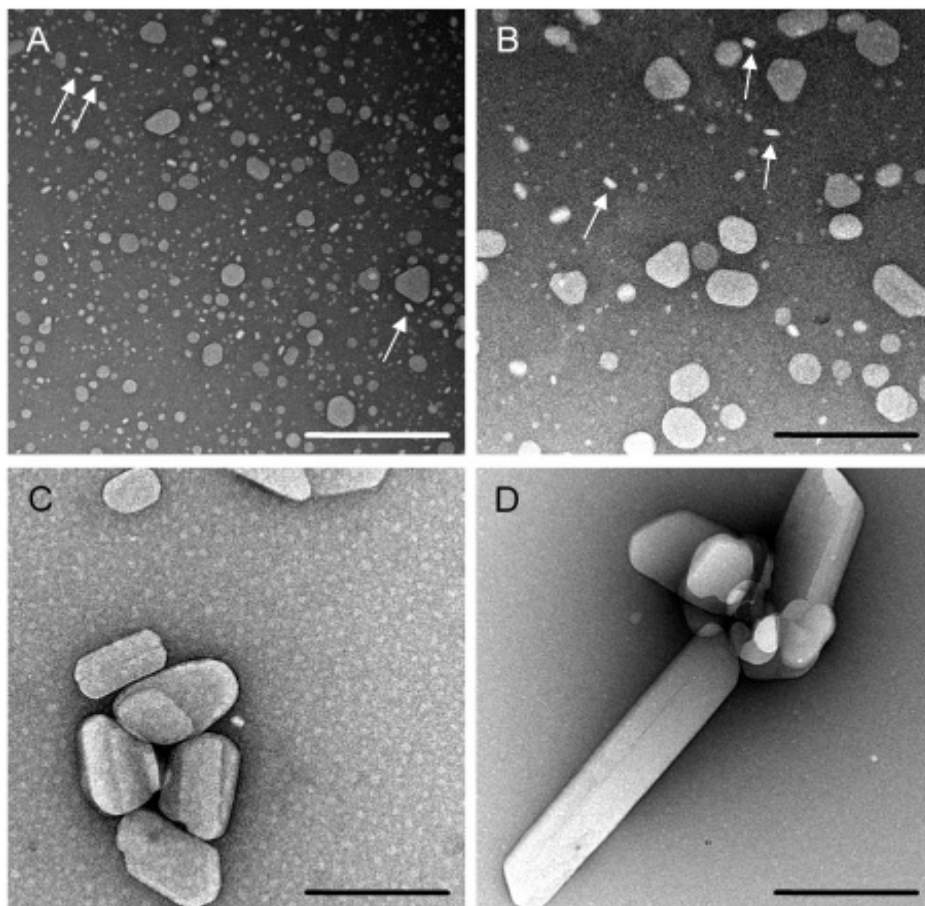
Der pH-Wert der ungepufferten Dispersionen lag bei 6,8 und der der unbeladenen Poloxamerlösungen bei 7,0 und 7,1 (Tabelle 4-4).



**Abbildung 4-19:** Thermogramme der unbeladenen Trimyristindispersionen. Links: Nanoemulsionen; rechts: Nanosuspensionen. Die Emulsionen enthielten 1,6 % freies Poloxamer und die Kristallisationsenthalpie des Trimyristins war mittels DSC auf etwa 1,5 J/g eingestellt worden. Die driftenden Basislinien bei E50 stammen möglicherweise daher, dass der Tiegel nicht einwandfrei verschweißt war. Bei den Suspensionen war weder der Gehalt des Poloxamers noch des Trimyristins gezielt eingestellt worden. Sie enthielten weniger als 4% freies Poloxamer und die Kristallisationsenthalpie des Trimyristins betrug um 5 J/g. Die Pfeile geben die Richtung und den zeitlichen Ablauf des Temperaturregimes an.



**Abbildung 4-20:** Z-Average-Durchmesser und Pdl-Werte der unbeladenen Trimyristindispersionen. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.



**Abbildung 4-21:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Trimyristinsuspensionen mit unterschiedlicher mittlerer Partikelgröße (Z-Average-Durchmesser). A: etwa 60 nm, B: etwa 100 nm, C: etwa 200 nm, D: etwa 400 nm. Die Pfeilspitzen markieren Partikel, deren Längskanten senkrecht zur Bildebene ausgerichtet sind. Die Suspensionen stammen nicht aus den gleichen Chargen wie für die Beladungsexperimente, wurden aber unter den gleichen Bedingungen hergestellt. Der Messbalken entspricht 500 nm.

**Tabelle 4-4:** pH-Werte der unbeladenen und beladenen Trimyristindispersionen und 1,6-prozentigen Poloxamerlösungen. Es wurden jeweils beide Ansätze je Dispersion oder Lösung vermessen und der Mittelwert daraus angegeben.

Dispersion	unbeladen	AMPHO	CURC	DIBU <sup>a</sup>	FENO	MEF <sup>b</sup>	PORPH	PROP
S50	6,8	7,1	7,0	10,7	7,7	2,5	7,1	8,0
S100	6,8	6,8	7,0	10,8	7,7	2,5	7,2	8,1
S200	6,8	—	—	10,6	7,8	2,4	—	8,0
Pol 1.6 %	7,1	7,5	7,1	10,9	8,2	2,4	7,4	n.b.
E50	6,8	6,0	6,7	10,5	7,4	2,5	6,8	7,2
E100	6,8	6,2	6,7	10,7	7,3	2,4	6,6	7,3
E200	6,8	—	—	10,7	7,0	2,5	—	7,1
E400	6,8	—	—	10,7	7,4	2,5	—	n.b.
Pol 1.6 %	7,0	7,1	6,7	10,9	7,7	1,7	n.b.	n.b.

<sup>a</sup>gepuffert auf pH 11 mit Phosphatpuffer (Gesamtpufferstärke 25 mM)

<sup>b</sup>gepuffert auf pH 1,6 mit KCl/HCl Puffer (Gesamtpufferstärke 75 mM)

n.b.: nicht bestimmt; —: Dispersion wurde für diesen Wirkstoff nicht untersucht.

### 4.3.5.3 Stabilität bei unterschiedlichen pH-Werten

DIBU und MEF sind dissoziierbare Moleküle. Da die Ladung der Wirkstoffe die Beladung möglichst nicht beeinflussen sollte, wurden Proben mit DIBU und MEF so gepuffert, dass diese Moleküle jeweils überwiegend in der neutralen Form vorlagen. Vor Auswahl der Puffersysteme wurde die pH-Empfindlichkeit der Emulsionen evaluiert. Zu diesem Zweck wurden je 200 µl Puffer (100 mM) mit 600 µl Emulsion versetzt, so dass die Gesamtpufferstärke 25 mM betrug. Die bei Raumtemperatur gelagerten Proben waren nach 11 Tagen makro- und mikroskopisch unauffällig. Bei pH 4 und 9 wurden zudem die Z-Average-Durchmesser und der Pdl bestimmt; beide hatten sich nur geringfügig geändert (Tabelle 4-5). Einschließlich der pH-Werte 1,7 und 11 für die Inkubation mit MEF und DIBU erwiesen sich die Trimyristinemulsionen somit über einen breiten pH-Bereich als stabil. Demnach können weitere dissoziierbare Wirkstoffe bei verschiedenen pH-Werten untersucht werden. Daten zur Stabilität einiger dieser Puffer bei Raumtemperatur finden sich in Tabelle A2-1 im Anhang.

### 4.3.6 Passive Beladung

#### 4.3.6.1 Beschichtungen

##### DIBU, FENO, MEF

Aus DIBU, FENO und MEF konnten Beschichtungen erzeugt werden. Bei FENO kristallisierten nicht alle Beschichtungen spontan aus, es wurden allerdings nur spontan kristallisierte für die Experimente verwendet. Da aus den Erfahrungen mit KuRei300 bekannt

**Tabelle 4-5:** pH-Werte und Partikelgrößencharakteristika (Z-Average-Durchmesser/ Pdl) verschieden gepufferter Trimyristinemulsionen in frischem und gelagertem Zustand. Die Pufferstärke betrug in allen Proben 25 mM.

pH-Wert	Puffer	E100	E200	E400
etwa 7	ohne	96 nm/ 0,061 <sup>a</sup>	190 nm/ 0,028 <sup>a</sup>	412 nm/ 0,126 <sup>a</sup>
1,7	KCl, HCl	97 nm/ 0,061 <sup>b</sup>	-	408 nm/ 0,119 <sup>b</sup>
4	Na-Acetate, Eisessig	97 nm/ 0,065 <sup>c</sup>	192 nm/ 0,065 <sup>c</sup>	416 nm/ 0,125 <sup>c</sup>
5	Na-Acetate, Eisessig	-	-	-
6	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	-
7	TRIS-Base, HCl	-	-	-
8	TRIS-Base, HCl	-	-	-
9	TRIS-Base, HCl	97 nm/ 0,058 <sup>c</sup>	190 nm/ 0,038 <sup>c</sup>	422 nm/ 0,147 <sup>c</sup>
11	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaOH	97 nm/ 0,104 <sup>b</sup>	-	422/ 0,117 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Vor der Pufferung. <sup>b</sup>Nach 3 Tagen Inkubation. <sup>c</sup>Nach 11 Tagen Inkubation.

war, dass sich bei der Herstellung von Beschichtungen der physikalische Zustand der eingesetzten Wirkstoffe ändern kann [209], wurde dieser mittels DSC überprüft. Als Vergleich dienten die Ausgangssubstanzen in der Form, wie sie vom Hersteller bezogen wurden.

Bei allen drei Wirkstoffen zeigten die Thermogramme keine offensichtlichen Unterschiede zu den Ausgangssubstanzen (Abbildung 4-22). Es wurde daher davon ausgegangen, dass die Wirkstoffe in ihrer ursprünglichen physikalischen Form vorlagen. Als Besonderheit ist im Thermogramm von MEF eine polymorphe Umwandlung zu sehen, die aus der Literatur bekannt ist [210].

### AMPHO, CURC, PORPH

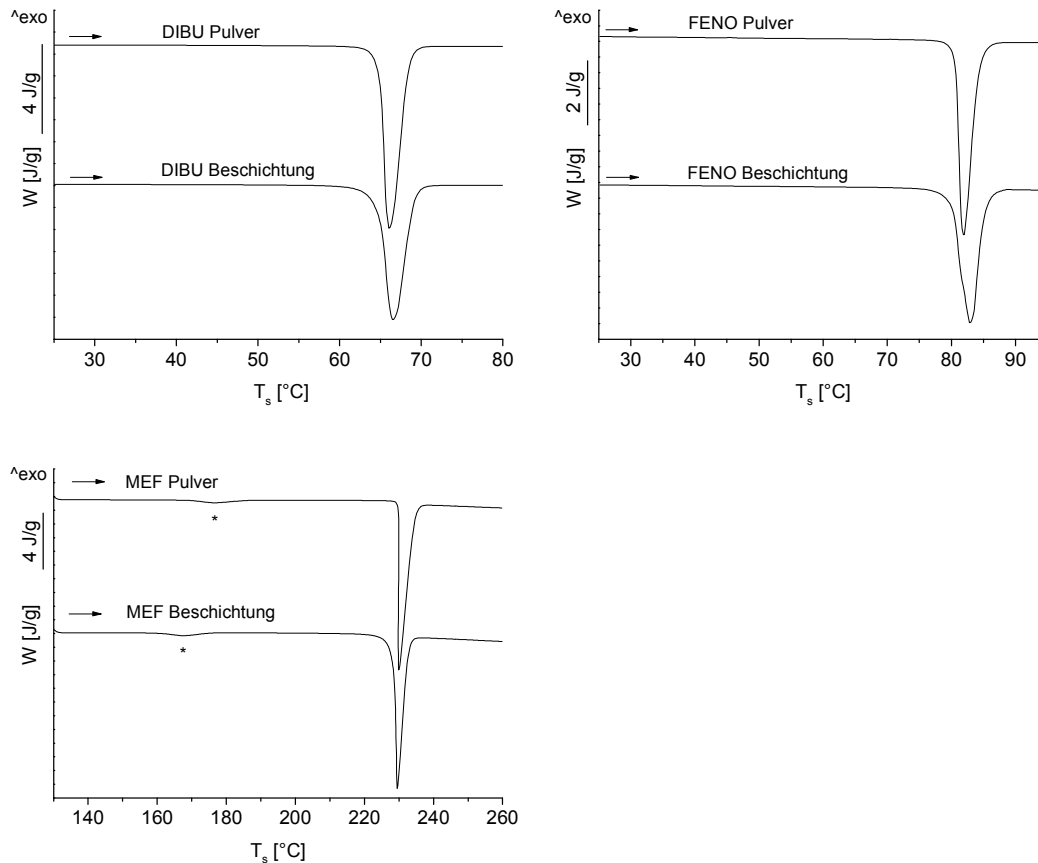
Für diese drei Wirkstoffe gelang es leider nicht, kristalline Beschichtungen zu erzeugen. Bei AMPHO wurde aus Kostengründen von vornherein auf Versuche verzichtet. Bei CURC und PORPH bildeten sich unabhängig vom Lösungsmittel stets lackartige Beschichtungen. AMPHO, CURC und PORPH wurden daher unverändert in der Form eingesetzt, wie sie vom Hersteller bezogen wurden.

### PROP

Da PROP bei Raumtemperatur eine viskose Flüssigkeit ist, entfiel die Entwicklung einer Beschichtung.

#### 4.3.6.2 Wirkstoffadsorption an Filtermembranen

Die Adsorptionstests für Filter mit PES-Membranen (MF 0,22) ergaben folgende Wiederfindungsraten: AMPHO 98,2 %, Curcumin 89 % und PORPH 98,7 %. Bei CURC liegt die ermittelte Beladung für die mit diesem Filter filtrierten Systeme E50 und E100 daher vermutlich etwas unter dem wahren Wert.



**Abbildung 4-22:** Thermogramme der Wirkstoffpulver und der zugehörigen Beschichtungen für Dibucain (DIBU), Fenofibrat (FENO) und Mefenaminsäure (MEF). Die Pfeile geben die Richtung des Temperaturregimes an; die Sterne markieren den polymorphen Übergang von Mefenaminsäure.

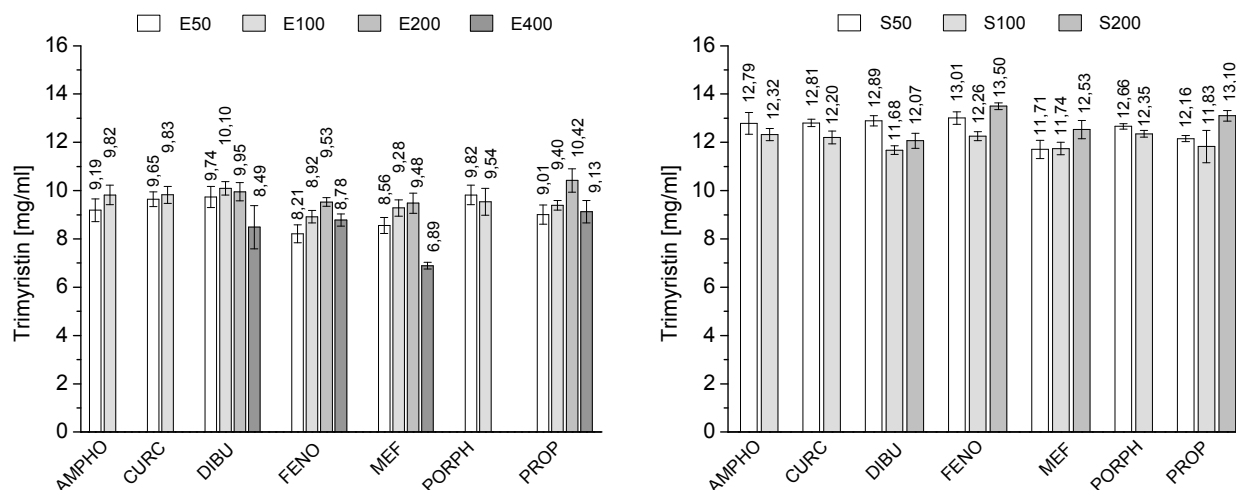
Die Adsorptionstests für Filter mit PVDF-Membranen (MF 0,45) ergaben folgende Wiederfindungsraten: AMPHO 98,8 %, CURC 97,6 % und PORPH 99,5 %.

#### 4.3.6.3 Trimyristingehalt der beladenen Dispersionen

Bei der Quantifizierung der Trimyristingehalts in den beladenen Dispersionen fiel auf, dass die Emulsionen durchgängig einen niedrigeren Gehalt als die Suspensionen hatten. Die Emulsionen enthielten durchschnittlich 9,26 mg/ml und die Suspensionen 12,42 mg/ml Trimyristin (Abbildung 4-23); das entspricht etwa 0,93 % beziehungsweise 1,24 %. Die Unterschiede sind mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass die Einstellung des Trimyristingehalts mittels DSC vor der Inkubation (3.2.2.4) für Emulsionen und Suspensionen zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte. Zwischenzeitlich war eine Softwarejustierung der DSC-Anlage durchgeführt worden.

Ursprünglich sollte der Trimyristingehalt mittels HPLC-ELSD quantifiziert werden. Da jedoch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit dem ELSD nicht zufriedenstellend war, wurde stattdessen auf den UV-Detektor zurückgegriffen (3.2.8.1). Sämtliche Ansätze, die





**Abbildung 4-23:** Trimyristingehalt der beladenen Dispersionen entsprechend der Bestimmung mit HPLC-UV. Links: Emulsionen; rechts: Suspensionen. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n=8$ .

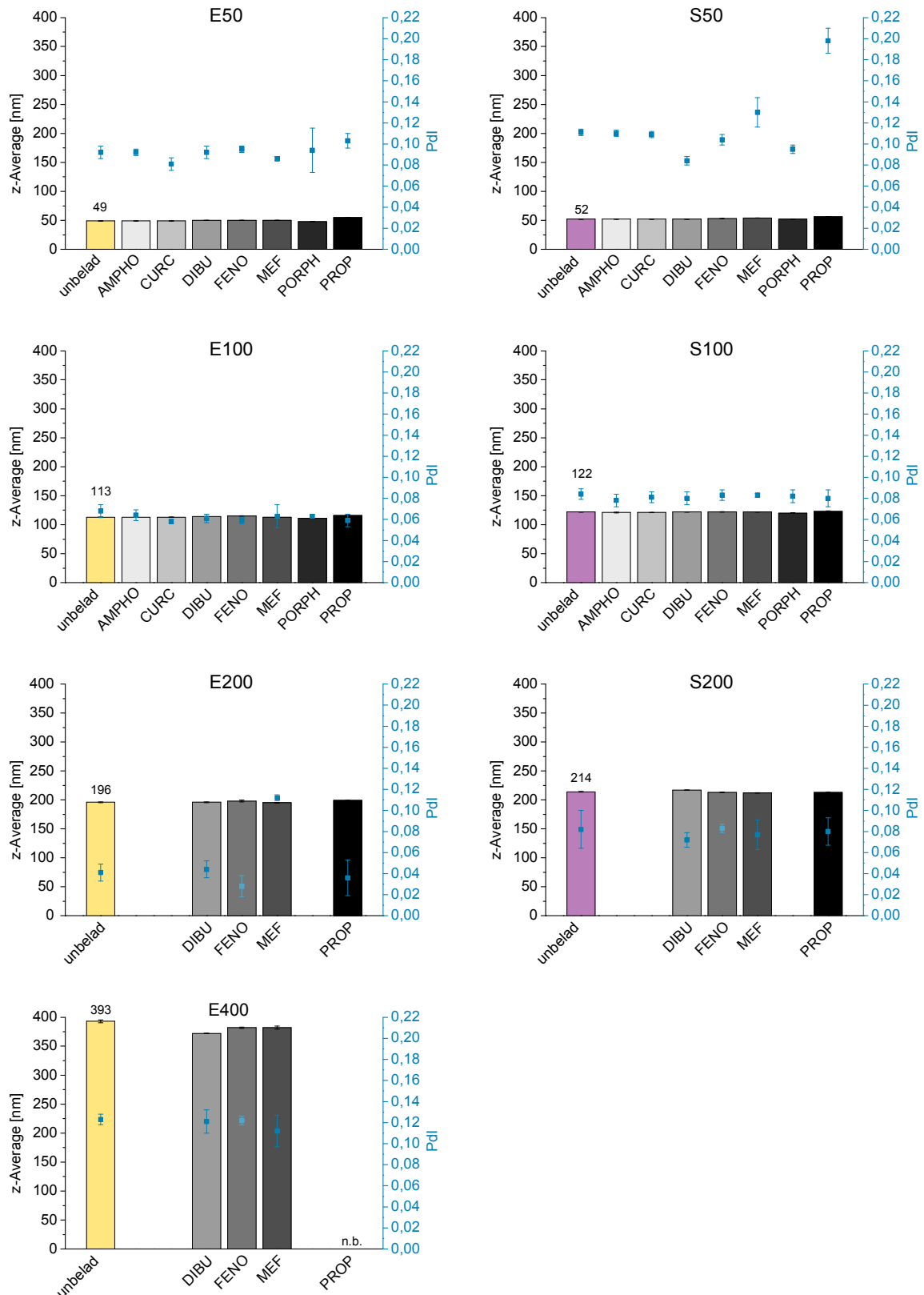
ELSD-Problematik zu lösen, wurden dokumentiert. Da diese Versuche aber nicht eigentlicher Inhalt der vorliegenden Arbeit waren und auch keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben, sind sie im Anhang dargestellt (A4 Anhang).

### 4.3.7 Physikochemische Charakterisierung der beladenen Dispersionen

#### 4.3.7.1 Partikelgrößen und pH-Werte

Die Beladung mit Wirkstoffen veränderte in nahezu allen Fällen weder Partikelgröße noch Pdl (Abbildung 4-24). Lediglich die Partikel der PROP-beladenen Dispersionen vergrößerten sich leicht, was vermutlich auf die außergewöhnlich hohe Beladung zurückzuführen ist. Im Fall von PROP-E400 konnten die Tröpfchen nicht mit Hilfe der PCS vermessen werden, weil die Probenqualität zu schlecht war; die Probe enthielt Mikropartikel.

Die pH-Werte der Dispersionen und der Poloxamerlösungen änderten sich nach der Beladung zumeist nur geringfügig (Tabelle 4-4). Auch die gepufferten Zubereitungen behielten den ursprünglichen pH-Wert bei. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Ladungen und Löslichkeiten von DIBU und MEF in etwa konstant blieben und somit keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatten. Aus unbekannten Gründen erhöhten sich die pH-Werte bei FENO- und PROP-beladenen Suspensionen. Da diese Substanzen jedoch nicht dissoziierbar sind, muss dadurch kein Einfluss auf Verteilungsprozesse befürchtet werden.



**Abbildung 4-24:** Z-Average-Durchmesser und PDI-Werte der beladenen und unbeladenen Trimyristindispersionen. Links: Nanoemulsionen; rechts: Nanosuspensionen. Beladen wurde mit folgenden Wirkstoffen: Amphotericin B (AMPHO), Curcumin (CURC), Dibucain (DIBU), Fenofibrat (FENO), Mefenaminsäure (MEF), Porphyrin (PORPH) und Propofol (PROP). Für die beladenen Dispersionen wurden die Werte an Tag 1-5 nach der Beladung ermittelt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. N.b.: nicht bestimmt aufgrund schlechter Dispersionsqualität; unbel: unbeladen.

#### 4.3.7.2 Physikalischer Zustand nach der Beladung

Der physikalische Zustand der beladenen Dispersionen wurde nicht routinemäßig überprüft, da sie bei kontrollierten 20°C gelagert wurden. Bei den PROP-beladenen Suspensionen ergaben sich allerdings Hinweise auf eine physikalische Veränderung der Partikelmatrix, die auch bestätigt wurde (4.3.8., Abschnitt Propofol). Aus diesem Grund wurden die Schmelzereignisse aller weiteren Suspensionen ebenfalls kontrolliert.

Keines der Thermogramme zeigte Veränderungen von Lage oder Größe des Schmelzpeaks (Abbildung 4-25), die im Zusammenhang mit der Beladung stehen könnten. Es wurde daher geschlussfolgert, dass die Beladung zu keinen physikalischen Veränderungen in den Partikeln der Nanosuspensionen geführt hat.

### 4.3.8 Solubilisierungsergebnisse

#### 4.3.8.1 Löslichkeit in der wässrigen Phase

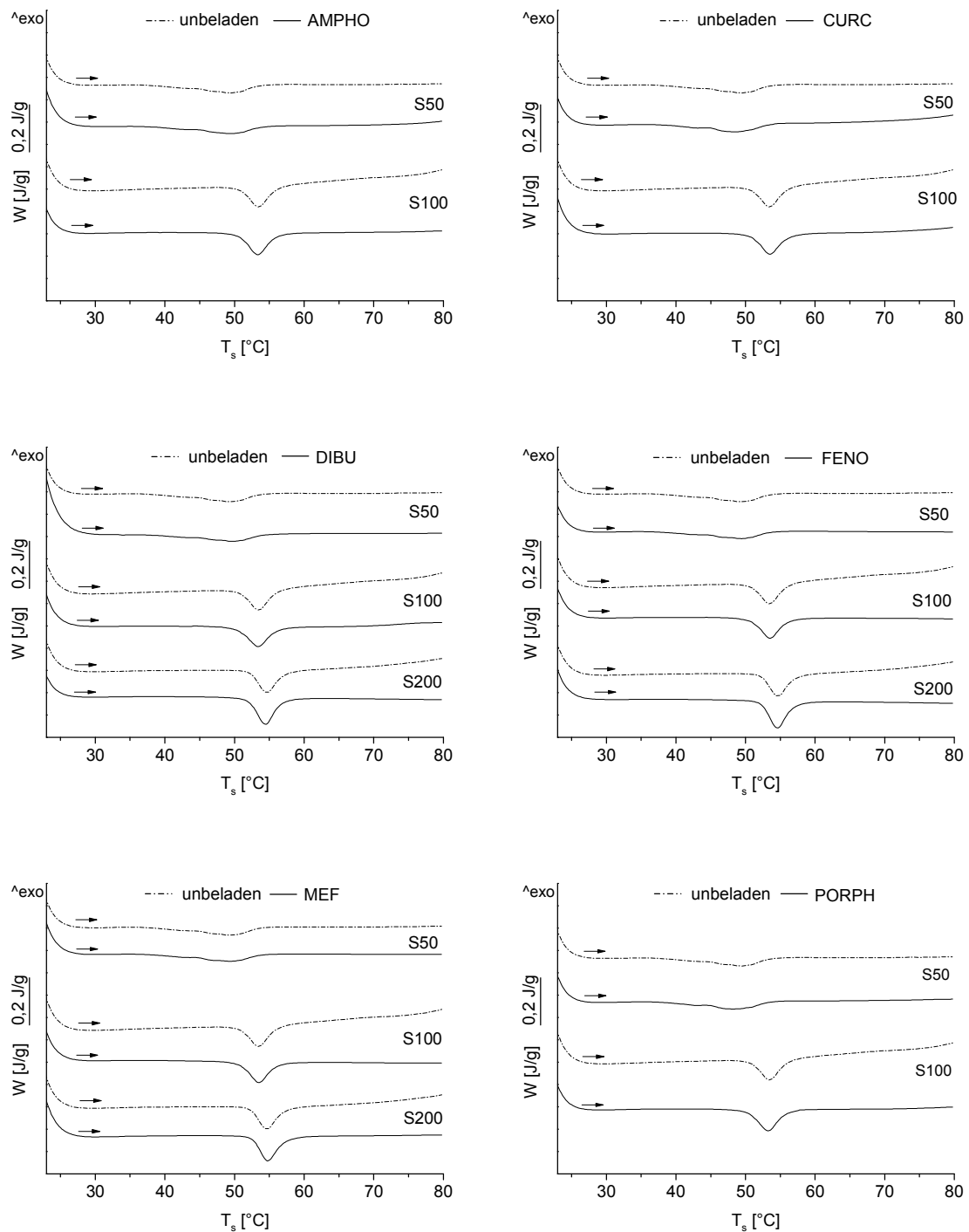
Um abgrenzen zu können, welchen Beitrag die Trimyristinnanopartikel zur Wirkstoffsolubilisierung in der jeweiligen Dispersion geleistet haben, wurden die Löslichkeiten in 1,6-prozentiger Poloxamerlösung ebenfalls bestimmt. Zur besseren Illustration dieses Zusammenhangs wurden in Abbildung 4-26 die absoluten Löslichkeiten der Wirkstoffe in der Poloxamerlösung und der jeweils am schlechtesten solubilisierenden Nanodispersion gegenüber gestellt. In Anbetracht der hohen Standardabweichung solubilisierter bei MEF die schlechteste Nanodispersion (E400) nur wenig mehr als die Poloxamerlösung. In allen anderen Fällen jedoch verbesserte die schlechteste Nanodispersion die Löslichkeit um mindestens Faktor 2. Bei CURC und PORPH kann die Löslichkeit in der Poloxamerlösung praktisch sogar vernachlässigt werden.

#### 4.3.8.2 Solubilisierung durch Trimyristinnanopartikel

Einen Eindruck vom Aussehen einiger der beladenen Dispersionen vermittelt Abbildung 4-27. Im Folgenden werden die Ergebnisse für jeden Wirkstoff oder jede Wirkstoffgruppe präsentiert.

##### Amphotericin B

Die Nanosuspensionen wiesen eine wesentlich höhere Beladung als die –emulsionen auf, wobei sich der Gehalt von AMPHO zwischen 22 und 494 µg/ml bewegte (Abbildung 4-28). Für sowohl Nanoemulsionen als auch –suspensionen zeigten sich die Dispersionen mit kleinerer Partikelgröße überlegen. Dieser Effekt war bei den Nanoemulsionen stärker ausgeprägt. Die gefundenen Ergebnisse weisen auf eine Oberflächenassoziation von AMPHO mit den Partikeln hin. Das ist nicht überraschend, da es sich bei AMPHO um ein amphiphiles Molekül handelt [211] und daher Grenzflächenaktivität

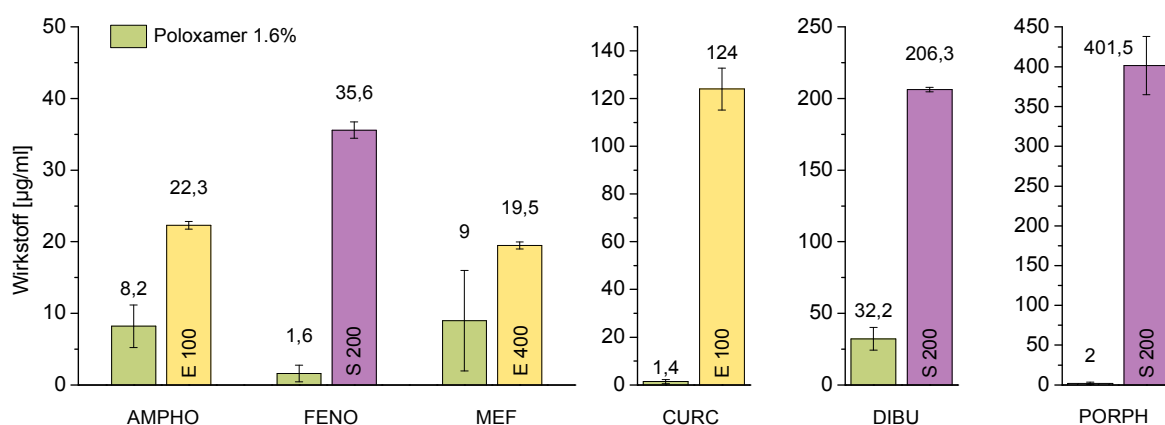


**Abbildung 4-25:** Thermogramme der unbeladenen und beladenen Nanosuspensionen mit Ausnahme von Propofol. Beladen wurde mit folgenden Wirkstoffen: Amphotericin B (AMPHO), Curcumin (CURC), Dibucain (DIBU), Fenofibrat (FENO), Mefenaminsäure (MEF) und Porphyrin (PORPH). Die unbeladenen Suspensionen enthielten 1,6 % freies Poloxamer und die Kristallisationsenthalpie des Trimyristins war mittels DSC auf etwa 1,5 J/g eingestellt worden. Die Pfeile geben die Richtung des Temperaturregimes an.

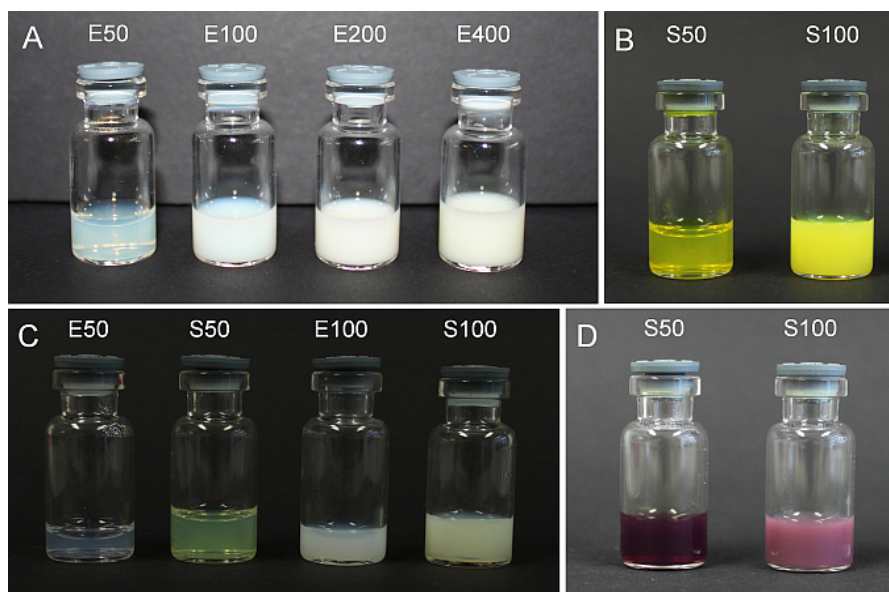
zu erwarten ist. Die quantitative Zunahme der Grenzfläche bei der Umwandlung eines Emulsionströpfchens in den zugehörigen kristallinen Partikel ist schwer abschätzbar (4.3.2). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die bloße Grenzflächenzunahme zu den

bemerkenswerten Beladungsunterschieden führt (E50 vs. S50 Faktor 6, E100 vs. S100 Faktor 17, Abbildung 4-29). Möglicherweise spielt die Eigenschaft von AMPHO, Dimere oder oligomere Selbstassoziate bilden zu können, eine Rolle [212]. Es ist denkbar, dass Poloxamere unterschiedlich mit Emulsionströpfchen und Suspensionskristallen interagieren, was sich in unterschiedlichen Arten der Wirkstoffanlagerung oder –einlagerung äußern könnte. Unter Umständen fördert die Organisation der Poloxamerketten an den festen Partikeloberflächen die Bildung von AMPHO-Selbstassoziaten. Ganz allgemein kann vermutlich angenommen werden, dass die Art des Stabilisators einen Einfluss auf die Solubilisierungseigenschaften von Nanodispersionen hat. Beispielsweise ist bekannt, dass Poloxamere bereits unterhalb der CMC Mizellartige Aggregate an Oberflächen bilden können [213]. Außerdem kann die Anwesenheit von hydrophoben (Wirkstoff)molekülen, die CMC beziehungsweise CMT von Poloxameren in wässriger Lösung senken. Gezeigt wurde dies unter anderem für Lokalanästhetika, Propofol und Ibuprofen [214–216].

Mit dem SolEmuls<sup>®</sup>-Verfahren (2.3.2) wurde in der kolloidalen Lipidemulsion Lipofundin 20 % N (Partikelmatrix Sojaöl, Emulgator Lecithin) 0,5 mg/ml AMPHO solubilisiert [143]. Bezogen auf den nominalen Gehalt an Sojaöl als Partikelmatrix sind das etwa 0,25 %. Das ist zwar reichlich ein Drittel mehr als mit der E100 (0,17 %) erzielt wurde, allerdings weniger als die Hälfte im Vergleich zur E50 (0,61 %). Die beiden Suspensionen waren sogar jeweils um mehr als den Faktor 10 überlegen (S50: 3,78 %; S100: 2,84 %). Prinzipiell ist demnach der hohe Energieeintrag durch Hochdruckhomogenisation für eine passive Beladung von Lipidnanopartikeln mit AMPHO (SolEmuls<sup>®</sup>) nicht notwendig. Es wäre interessant zu untersuchen, zu welchem Ergebnis die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Art der passiven Beladung von Lipofundin 20 % N mit AMPHO führt. Dabei ist zu



**Abbildung 4-26:** Löslichkeit der Wirkstoffe in 1,6-prozentiger Poloxamerlösung und in der jeweils am schlechtesten solubilisierenden Nanodispersion. Es wurden folgende Wirkstoffe untersucht: Amphotericin B (AMPHO), Fenofibrat (FENO), Mefenaminsäure (MEF), Curcumin (CURC), Dibucain (DIBU) und Porphyrin (PORPH). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben; Poloxamerlösung  $n=8$ , Nanodispersionen  $n=4$ .

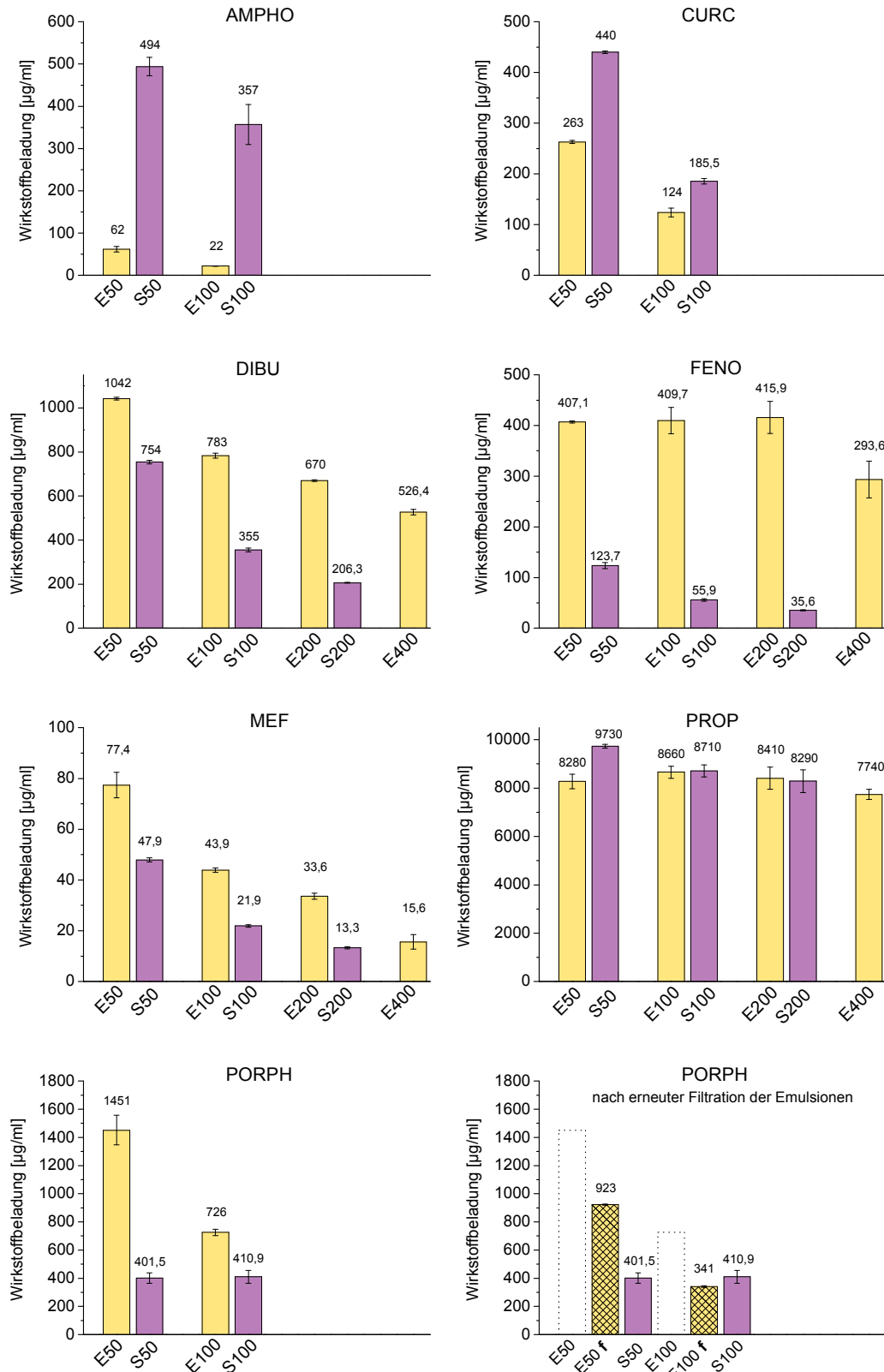


**Abbildung 4-27:** Repräsentative beladene Dispersionen mit unterschiedlichen Wirkstoffen. A: Propofol; B: Curcumin; C: Amphotericin B; D: Porphyrin.

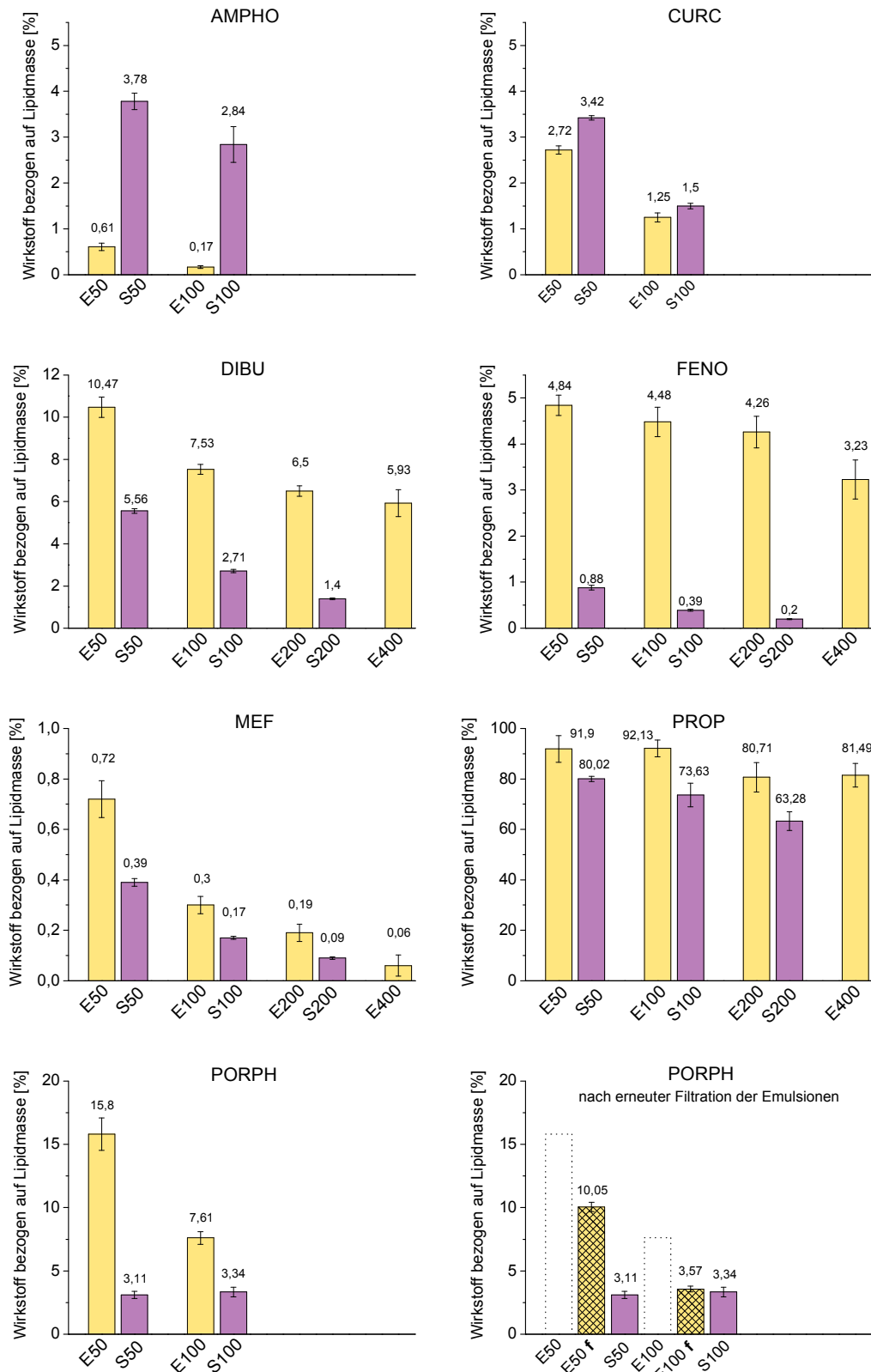
berücksichtigen, dass AMPHO bei der SolEmuls<sup>®</sup>-Methode möglicherweise nicht nur durch die Sojaöltröpfchen von etwa 240 nm Durchmesser [143] solubilisiert wurde, sondern auch durch das enthaltene Lecithin. Dieses liegt in phospholipidstabilisierten Nanoemulsionen nicht nur an den Partikelgrenzflächen, sondern häufig zusätzlich in Form von Liposomen vor [47]. Die Hochdruckhomogenisation könnte als Begleiterscheinung also AMPHO liposomal formuliert haben; Liposomen sind bewährte Trägerpartikel für AMPHO [200]. Der Vergleich der erzielten prozentualen Beladung mit dem kommerziellen Präparat AmBisome<sup>®</sup> kann nicht erfolgen, weil der Hersteller keine konkreten Angaben zur Menge der verwendeten Phospholipide macht. Er empfiehlt für die applikationsfertige Infusion eine maximale Konzentration von 2 mg/ml AMPHO. Um diese mit der am besten solubilisierenden Dispersion S50 zu erreichen, wäre ein Trimyristingehalt von etwa 5,3 % notwendig.

### Curcumin

Im Prinzip ähnelte das Beladungsbild dem von AMPHO (Abbildung 4-29). Die Überlegenheit der Suspensionen gegenüber den Emulsionen war allerdings wesentlich schwächer ausgeprägt. Deutlich war jedoch wieder die höhere Beladung der kleineren Partikel (E50 vs. E100 Faktor 2, S50 vs. S100 Faktor 2). Ein großer Oberflächenbeitrag zur Beladung ist demnach auch bei CURC zu vermuten. Es wurden Beladungen zwischen 124 und 440 µg/ml erreicht (Abbildung 4-28). Das relativ gute Abschneiden der Emulsion im Vergleich zur Suspension deutet darauf hin, dass die geringere spezifische Oberfläche durch Lösen des CURC im flüssigen Lipid zumindest teilweise kompensiert wird. Eine Arbeitsgruppe aus Halle belud Trimyristin-Poloxamer-Nanodispersionen mit Curcuminoiden auf dem klassischen Weg



**Abbildung 4-28:** Effekt der Größe und des physikalischen Zustands der Partikel von Trimyristindispersionen auf die absolut erzielbare Beladung. Beladen wurde mit folgenden Wirkstoffen: Amphotericin B (AMPHO), Curcumin (CURC), Dibucain (DIBU), Mefenaminsäure (MEF), Propofol (PROP) und Porphyrin (PORPH). PORPH: „f“ bezeichnet Nanoemulsionen, die nach dem Auftreten von Kristallen nochmals filtriert wurden; zum besseren Vergleich geben die gepunkteten Balken die Werte vor dem Auftreten der Kristalle an. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben,  $n=4$ . Da aus AMPHO, CURC und PORPH keine Beschichtungen erzeugbar waren, wurden filtrationsbedingt nur 50er- und 100er-Dispersionen untersucht.



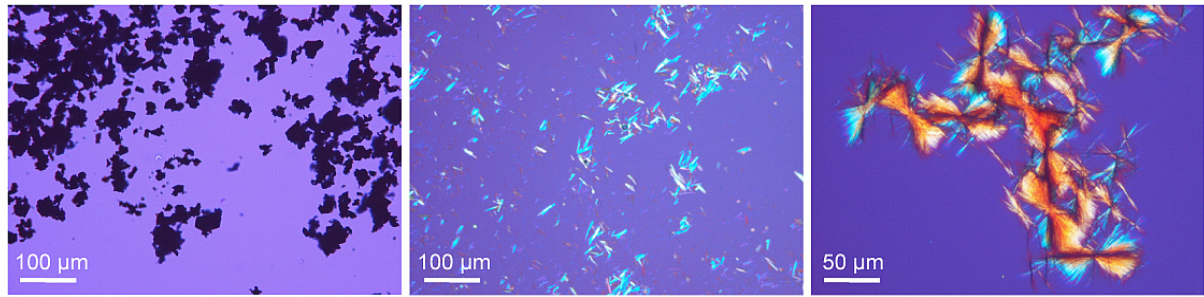
**Abbildung 4-29:** Effekt der Größe und des physikalischen Zustands der Partikel von Trimyristindispersionen auf die relativ erzielbare Beladung. Beladen wurde mit folgenden Wirkstoffen: Amphotericin B (AMPHO), Curcumin (CURC), Dibucain (DIBU), Mefenaminsäure (MEF), Propofol (PROP) und Porphyrin (PORPH). PORPH: „f“ bezeichnet Nanoemulsionen, die nach dem Auftreten von Kristallen nochmals filtriert wurden; zum besseren Vergleich geben die gepunkteten Balken die Werte vor dem Auftreten der Kristalle an. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben,  $n=4$ . Da aus AMPHO, CURC und PORPH keine Beschichtungen erzeugbar waren, wurden filtrationsbedingt nur 50er- und 100er-Systeme untersucht.



(*de novo*). Die Emulsionen (Z-Average-Durchmesser 165 nm) und Suspensionen (Z-Average-Durchmesser 185 nm) enthielten bezogen auf Trimyristin 0,5 % bis 1 % Curcuminoiden [132]. Die Autoren spezifizierten allerdings nicht, welche Dispersion wie viel enthielt und ob es sich dabei um die maximale Beladung handelte. Auch unter Berücksichtigung der Partikelgrößen scheinen mit der passiven Beladung aber Curcuminkonzentrationen einer ähnlichen Größenordnung erzielt werden zu können: E50: 2,72 %; E100: 1,25 %; S50: 3,42 % und S100: 1,5 %. Die Hallenser Autoren schlossen aus Untersuchungen mittels Raman- und Fluoreszenzspektroskopie, dass sich die Curcuminoiden bei flüssigen Partikeln in der Matrix und in der Grenzfläche, bei festen Partikeln ausschließlich in der Grenzfläche aufhalten. Die selbst gefundenen Ergebnisse stehen in Einklang mit diesen Literaturangaben.

### **Dibucain, Fenofibrat, Mefenaminsäure**

Bei diesen Wirkstoffen unterschieden sich die Beladungsmuster in einem grundsätzlichen Aspekt von denen von AMPHO und CURC: die Emulsionen waren höher beladen als die Suspensionen (Abbildung 4-29). Das bedeutet, dass sich die Wirkstoffmoleküle vorzugsweise im Inneren der flüssigen Tröpfchen und nicht in der kristallinen Matrix der festen Nanopartikel aufhalten. Die Überlegenheit der Emulsionen im Vergleich zu den Suspensionen nahm in folgender Reihenfolge zu: MEF < DIBU < FENO (Abbildung 4-29). In Bezug auf die gesamte Wirkstoffbeladung besaß FENO demnach die beste Löslichkeit in Trimyristin und die geringste Wirkstoffmenge an der Tröpfchenoberfläche. Bei allen drei Wirkstoffen verdoppelte sich die Beladung der Nanosuspensionen, wenn die Partikelgröße um die Hälfte reduziert wurde (Abbildung 4-29). Für die Nanoemulsionen konnte keine so eindeutige Korrelation beobachtet werden. Trotzdem war eine geringere Partikelgröße stets vorteilhaft. Das belegt, dass ein gewisser Anteil des Wirkstoffs an der Oberfläche assoziiert sein muss. Bei FENO und DIBU wuchs die Beladungsdifferenz zwischen Nanoemulsion und –suspension mit zunehmender Partikelgröße (z.B.: FENO: E50 vs. S50 Faktor 5,5; E100 vs. S100 Faktor 11,5; E200 vs. S200 Faktor 21). Zu erklären ist dies damit, dass sich bei reduzierter Partikelgröße der Nanosuspensionen die Beladung jeweils verdoppelte, während sie sich bei den Nanoemulsionen kaum änderte. Das legt stark nahe, dass bei den Nanoemulsionen die Beladung lipidmassenabhängig ist (d.h. Beladung primär im Tröpfchen) während sie bei den Nanosuspensionen oberflächenabhängig ist (d.h. Assoziation an der Kristalloberfläche). Bei MEF war dieser Effekt schwächer ausgeprägt, was mit der relativ hohen Löslichkeit in der Poloxamerlösung zusammenhängen kann (Abbildung 4-26). Die absoluten Beladungen betrugen bei DIBU 206-1042 µg/ml, bei FENO 36-416 µg/ml und bei MEF 13-77 µg/ml (Abbildung 4-28).

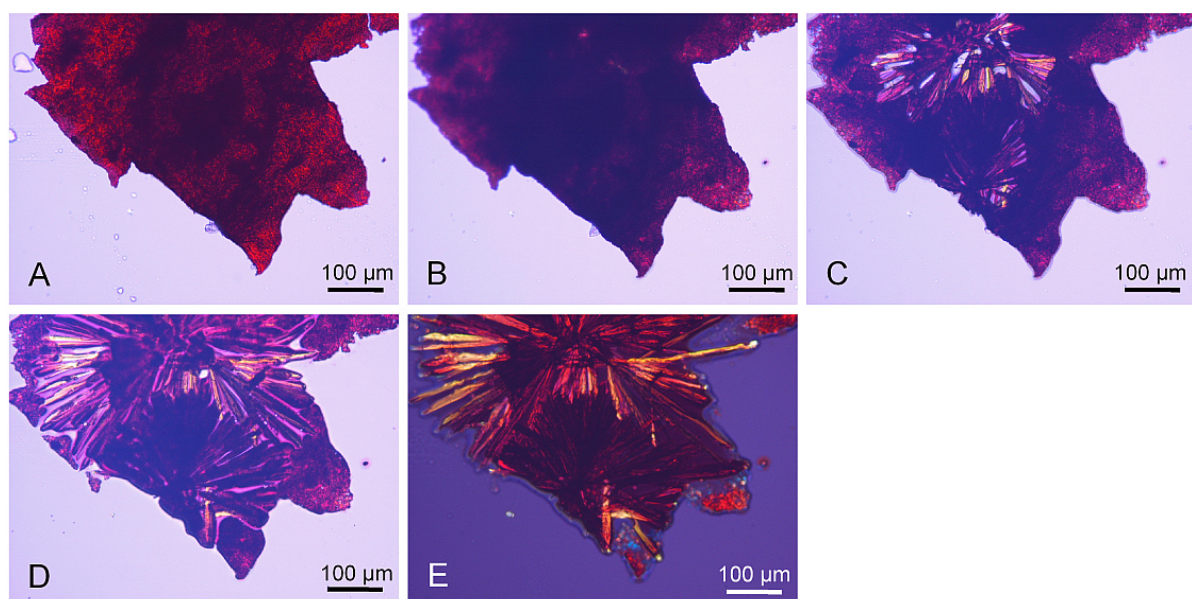


**Abbildung 4-30:** Polarisationsmikroskopische Aufnahmen von Porphyrin. Links: Ausgangssubstanz; Mitte: Kristalle, die etwa zwei Tage nach Ende der Inkubation in den beladenen Emulsionen auftraten; rechts: die gleichen Kristalle nach etwa einer Woche.

### 5,10,15,20-tetrakis(4-hydroxyphenyl)-21H,23H-porphin

Die Beladungen bewegten sich zwischen 1451 und 411 µg/ml. Besonders bei den Nanoemulsionen erschien das auf den ersten Blick im Vergleich zu den bisher besprochenen Wirkstoffen recht viel (Abbildung 4-28). Einen Tag nach der Filtration der beladenen Emulsionen bildeten sich jedoch viele kleine Kristalle, die innerhalb weniger Tage zu garbenartigen Bündeln heranwuchsen (Abbildung 4-30).

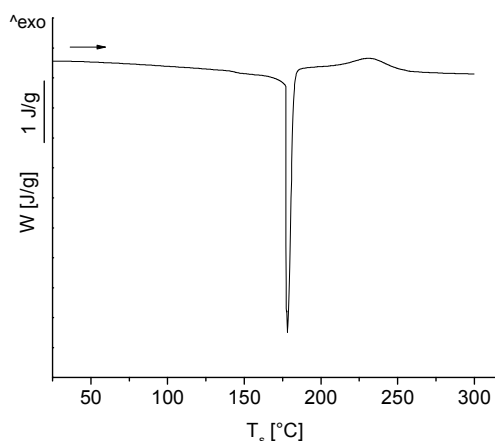
Um festzustellen, ob Überladung mit anschließender Rekristallisation aufgetreten war, wurden die Emulsionen nochmals filtriert und die Kristalle gewonnen. Der Filterkuchen wurde mittels Heiztischmikroskopie untersucht. Obwohl die Kristalle genauso violett wie das ursprünglich eingesetzte PORPH waren, verhielten sie sich anders. Während PORPH bis 315°C keinen sichtbaren Veränderungen unterlag, veränderte der Filterkuchen bei 190°C



**Abbildung 4-31:** Polarisationsmikroskopische Aufnahmen des Filterkuchens, der aus den Kristallen in den mit Porphyrin beladenen Emulsionen gewonnen wurde. A: Raumtemperatur; B: 169°C; C-E: 190°C.

sein Aussehen (Abbildung 4-31). Er schmolz offenbar und zeitgleich wuchsen strahlenartige Strukturen aus der Schmelze. Da kleine Bläschen aus der Schmelze aufstiegen, könnte man auf das Vorliegen eines Hydrates schließen. Thermogravimetrische Analysen oder DSC wären geeignet gewesen, um diese Vermutung zu untermauern, konnten jedoch wegen eines Mangels an isolierten Kristallen nicht durchgeführt werden. In jedem Fall stellten die Kristalle eine veränderte Form des ursprünglich eingesetzten PORPH dar. Es hatte somit keine eigentliche Rekristallisation im engeren Sinn stattgefunden. Erwartungsgemäß war die PORPH-Beladung der Emulsionen nach der erneuten Filtration geringer als vorher (E50 15.8 % vs. 10.1 %; E100 7.6 % vs. 3.6 %, Abbildung 4-29). Innerhalb von drei Monaten wurden keine neuen Kristalle entdeckt. Überraschenderweise unterschieden sich die Nanosuspensionen unterschiedlicher Partikelgröße nicht in der Beladungsmenge, wie es bei den zuvor besprochenen Wirkstoffen der Fall war.

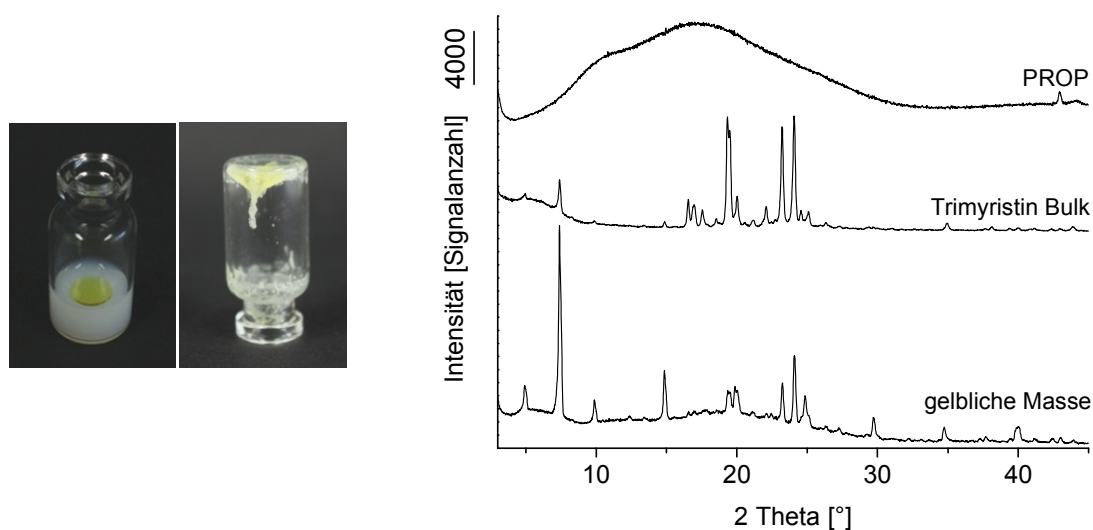
Die Resultate für PORPH müssen allerdings vorsichtig interpretiert werden. Die entdeckten Kristalle konnten nicht eindeutig identifiziert werden und könnten ebenso eine andere Modifikation der Ursprungssubstanz darstellen. Thermogramme der Ursprungssubstanz waren nur sehr schlecht reproduzierbar und zeigten mitunter schwer interpretierbare Verläufe. Ein gut definiertes Beispiel eines Thermogramms zeigt Abbildung 4-32. Nach dem großen endothermen Ereignis, das vermutlich ein Schmelzen ist, schließt sich ein kleineres, breiteres an. Dieses könnte als polymorphe Umwandlung gedeutet werden. Leider waren diese Ereignisse unter dem Mikroskop nicht in dieser Weise zu erkennen. Es kommt hinzu, dass der Hersteller den Schmelzpunkt von PORPH lediglich mit „< 300°C“ angibt. All das deutet darauf hin, dass die Substanz ein komplexes physikochemisches Verhalten hat, das für die Interpretation von Beladungsexperimenten nachteilig ist.



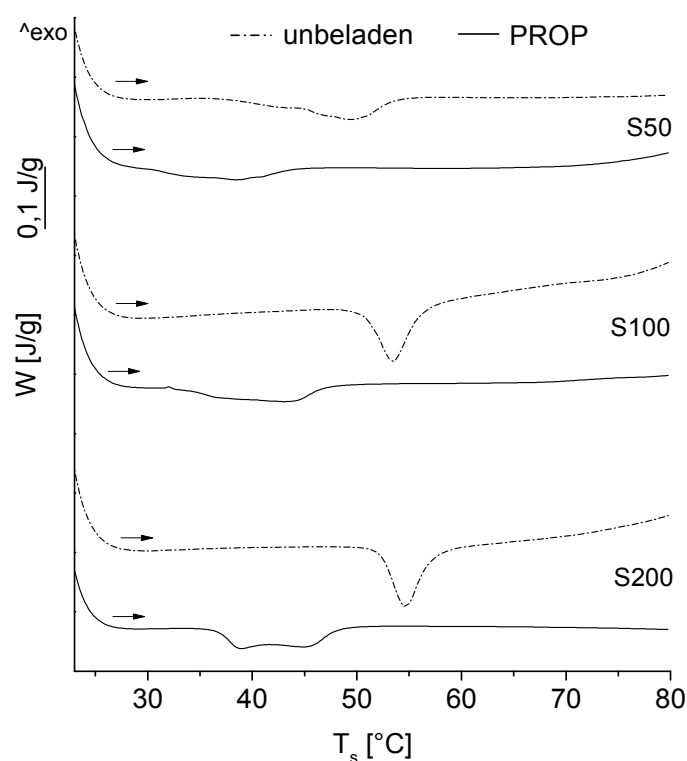
**Abbildung 4-32:** Thermogramm für Porphyrin in Form des eingesetzten Pulvers. Der Pfeil gibt die Richtung des Temperaturregimes an.

## Propofol

Die Ergebnisse waren in mehrerlei Hinsicht bemerkenswert. Besonders auffallend war die extrem hohe Beladung. Sie lag absolut zwischen 7,74 und 9,73 mg/ml und relativ zwischen 63 % und 92 % (Abbildung 4-28 und Abbildung 4-29). Bei allen anderen Wirkstoffen bewegte sich die relative Beladung zwischen 1 % und 16 %. Die Emulsionen erwiesen sich als geringfügig vorteilhaft gegenüber den Suspensionen, aber es war kaum ein Partikelgrößeneffekt erkennbar (Abbildung 4-29). Noch interessanter ist jedoch die Tatsache, dass überschüssiges PROP nach der Inkubation überhaupt abfiltriert werden konnte. PROP ist bei Raumtemperatur eine gelbe Flüssigkeit (Schmelzpunkt 18°C) und schwamm auf der Oberfläche der Dispersionen wie ein Öltropfen auf. Nach einigen Stunden bildete sich jedoch eine klebrige, gelbliche Masse (Abbildung 4-33, Fotos), die charakteristisch nach PROP roch. Da sich die Masse nicht bildete, wenn PROP mit reiner Poloxamerlösung inkubiert wurde, musste von einer Interaktion mit Trimyristin ausgegangen werden. Daraufhin wurden WAX-Diffraktogramme für PROP, Bulktrimyristin und die fragliche Masse aufgenommen (Abbildung 4-33, Diffraktogramm). Erwartungsgemäß führte das flüssige PROP lediglich zu einem Halo, während Trimyristin ein Reflexmuster erzeugte, wie es typisch für kristalline Substanzen ist. Die Diffraktogramme der klebrigen Masse zeigten sowohl trimyristinartige Reflexe als auch einen unterliegenden Halo. Demzufolge bestand die Mischung aus PROP und Trimyristin. In Anbetracht dieser Ergebnisse war fraglich, ob die Partikel der PROP-beladenen Suspensionen noch in ihrem ursprünglichen kristallinen Zustand vorlagen. Zur Klärung dieser Frage wurden Thermogramme der PROP-beladenen Nanosuspensionen aufgezeichnet und mit denen unbeladener verglichen (Abbildung 4-34). In den



**Abbildung 4-33:** Fotos: Trimyristin-Nanoemulsion inkubiert mit Propofol. Links: frisch; rechts: nach einigen Stunden. Für die Suspensionen bot sich das gleiche Bild. Graphik: WAX-Diffraktogramme von Propofol (PROP), Trimyristin und der eutektischen Masse, die sich während der Inkubation mit den Trimyristinnanodispersionen gebildet hatte.



**Abbildung 4-34:** Thermogramme der unbeladenen und mit Propofol (PROP) beladenen Trimyristinsuspensionen. Die unbeladenen Suspensionen enthielten 1,6 % freies Poloxamer und die Kristallisationsenthalpie des Trimyristins war mittels DSC auf etwa 1,5 J/g eingestellt worden. Die Pfeile geben die Richtung des Temperaturregimes an.

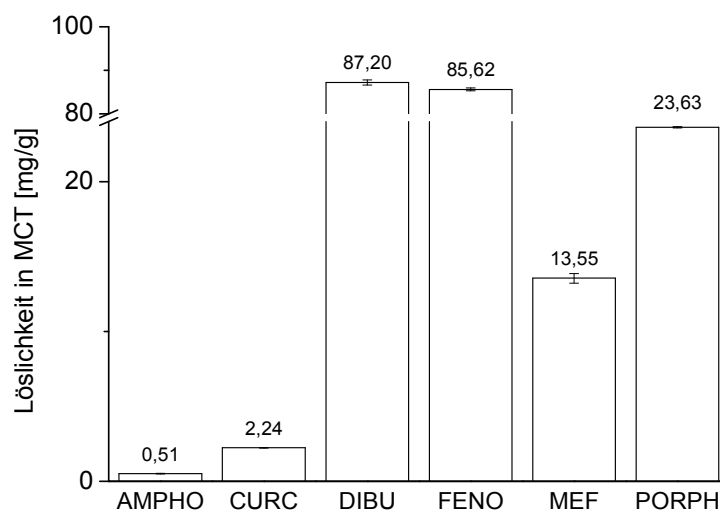
Thermogrammen der PROP-beladenen Nanosuspensionen waren die ursprünglichen Schmelzpeaks der Trimyristinkristalle kaum noch als solche identifizierbar. Darüberhinaus waren diese rudimentären Schmelzereignisse zu deutlich niedrigeren Temperaturen hin verschoben (Abbildung 4-34). Die Beladung mit PROP führte offensichtlich zu einer Art Mischung mit markanter Veränderung des physikalischen Zustandes der Partikel in den Nanosuspensionen. Auch wenn sie nicht vollständig verflüssigt wurden, so lagen sie eindeutig nicht mehr in ihrem ursprünglichen vollständig kristallinen Ausgangszustand vor. Ein ähnliches eutektisches Verhalten wurde auch bei Tripalmitinnanopartikeln beobachtet, die hoch mit Ubidecarenon beladen waren [82].

Bezüglich der Bildung der klebrigen Masse wäre denkbar, dass sich einige der Trimyristinnanopartikel in PROP gelöst haben. Dadurch würden sie allerdings den nanopartikulären Größenbereich verlassen und im Fall der Emulsionen die Fähigkeit verlieren, weiterhin als unterkühlte Schmelze bei Raumtemperatur vorzuliegen. Ab einem ausreichend großen Mengenanteil von Trimyristin in der Mischung würde demzufolge sowohl in Emulsionen als auch Suspensionen eine (halb)feste, (teil)kristalline Masse gefunden werden.

Auch in Fertigpräparaten spiegelt sich die hohe Lipophilie von Propofol wider. Die kolloidale Emulsion Propofol® Lipuro enthält bis zu 20 mg Propofol auf 50 mg Sojaöl bezogen. Das entspricht einer Beladung von 40 %. Den praktischen Erfahrungen in dieser Arbeit nach zu urteilen, wäre es vorstellbar, dass auch bei der industriellen Herstellung Propofol einfach in der unbeladenen kolloidalen Emulsion gelöst wird.

#### 4.3.8.3 Korrelation der Beladungshöhe von Wirkstoffen in den Emulsionen mit der Löslichkeit in MCT

Es sollte die Frage beleuchtet werden, inwiefern die Löslichkeit eines Wirkstoffs mit der Löslichkeit im Bulklipid korreliert. Da Trimyristin bei Raumtemperatur fest ist, wurden die Wirkstofflöslichkeiten ersatzweise in MCT abgeschätzt (Abbildung 4-35). Bis auf Propofol lösten sich alle Wirkstoffe zu unter 10 % in MCT. Für Propofol wurde die Zugabe von Wirkstoff abgebrochen, als sich bereits 150% in MCT gelöst hatten; vermutlich sind beide Substanzen unbegrenzt mischbar. Propofol fiel auch bei der Beladung der Trimyristindispersionen durch sehr hohe Wirkstoffkonzentrationen auf. Die prozentuale Beladung in MCT reiht sich für die übrigen Wirkstoffe wie folgt: AMPHO 0,051 %, CURC 0,22 %, MEF 1,36 %, PORPH 2,36 %, FENO 8,56 % und DIBU 8,72 %. Bei den Emulsionen soll als Vergleich die E100 herangezogen werden, denn dieses System ist für alle Wirkstoffe untersucht worden. Hier ist die Reihenfolge: AMPHO 0,17 %, MEF 0,3 %, CURC 1,25 %, PORPH 3,57 %, FENO 4,48 % und DIBU 7,53 %. Die Reihung bleibt, bis auf die Werte für CURC, erhalten. CURC erzielte eine viermal so hohe Beladung wie MEF in der E100, seine Löslichkeit in MCT war aber nur ein Sechstel so groß wie die von MEF. Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass CURC grenzflächenaktiver ist als MEF. Im Gegensatz zu



**Abbildung 4-35:** Löslichkeit der Wirkstoffe Amphotericin B (AMPHO), Curcumin (CURC), Dibucain (DIBU), Fenofibrat (FENO), Mefenaminsäure (MEF) und Porphyrin (PORPH) in MCT. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben,  $n=2$ .

MEF schnitten nämlich die Suspensionen besser ab als die Emulsionen (Abbildung 4-29). Für einen Wirkstoff betrachtet, ist der Vergleich zwischen der Löslichkeit in MCT und der Solubilisation in einer Trimyristinemulsion nur begrenzt möglich, weil es zwei unterschiedliche Lipide betrifft. Grundsätzlich ist zu vermuten, dass das Lösen im Bulk lipid eine gute Möglichkeit ist, die Eignung einer Lipidmatrix für eine kolloidale Trägeremulsion zu prüfen. Im Zweifelsfall wird damit die Beladungskapazität für den Wirkstoff eher unterschätzt, denn die Nanopartikel bieten zusätzliche Grenzflächen. Je kleiner die Partikel sind und je grenzflächenaktiver der Wirkstoff ist, um so größer wird die Unterschätzung sein.

#### 4.3.8.4 Lagerstabilität der beladenen Dispersionen

Alle beladenen Dispersionen wurden nach einigen Monaten polarisationsmikroskopisch auf physikalische Instabilität und das Auftreten von rekristallisiertem Wirkstoff untersucht. Die weitaus meisten Dispersionen zeigten keine Hinweise auf Mikropartikel und in keiner Probe fanden sich Kristalle (Tabelle 4-6). Bei den PROP-haltigen Systemen wiesen die Emulsionen E200 und E400 mikroskopisch sichtbare Tröpfchen auf, so dass sich offensichtlich Propofol oder eine flüssige Mischung aus Propofol und Trimyristin abgeschieden hatte. An Hand der Farbe – reines Propofol ist eine gelbe Flüssigkeit – konnte dies bei den nur wenige Mikrometer großen Tropfen nicht differenziert werden. Diese Proben waren vermutlich auf Grund der hohen Beladung (Abbildung 4-29) physikalisch instabil.

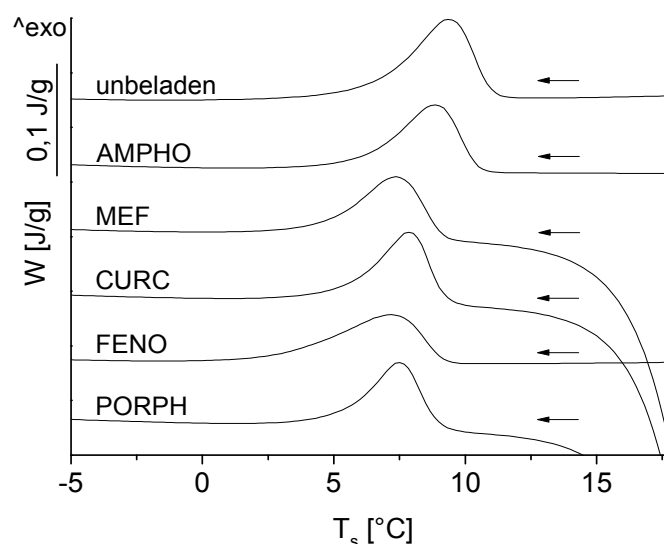
**Tabelle 4-6:** Ergebnisse der polarisationsmikroskopischen Untersuchung der beladenen Dispersionen auf Kristalle. Angegeben sind der Zeitpunkt der Untersuchung nach Beladung/ eventuelle Beobachtungen.

	D	E50	E100	E200	E400	S50	S100	S200
WS								
AMPHO		6,5 M/-	6,5 M/ -	n. bel.	n. bel.	4 M/ -	4 M/ -	n. bel.
CURC		7 M/ -	7 M/ -	n. bel.	n. bel.	4 M/ -	4 M/ -	n. bel.
DIBU		2,5 M/ -	2,5 M/ -	2,5 M/ -	2,5 M/ -	3,5 M/ -	3,5 M/ -	3,5 M/ -
FENO		6 M/ -	6 M/ -	6 M/ -	6 M/ -	4 M/ -	4 M/ -	4 M/ -
MEF		7 M/ -	7 M/ -	7 M/ -	7 M/ -	4 M/ -	4 M/ -	4 M/ -
PORPH		7 M/ -	7 M/ -	n. bel.	n. bel.	4 M/ -	4 M/ -	n. bel.
PROP		7 M/ -	7 M/ -	7 M/ Tröpfchen*	7 M/ Tröpfchen*	n. u.	n. u.	n. u.

n. bel.: Diese Dispersion wurde nicht mit dem entsprechenden Wirkstoff beladen. n.u.: Probe wurde nicht untersucht.  
 -: keine Kristalle; M: Monate; \*: Trat auf in einer von zwei Proben.

#### 4.3.8.5 Absenkung der Kristallisationstemperatur von Trimyristin in beladenen Emulsionen

Ursprünglich war in Betracht gezogen worden, den Trimyristingehalt der Dispersionen nach Inkubation und Filtration mittels DSC zu ermitteln. Aus diesem Grund wurden für einige beladene Emulsionen Thermogramme aufgezeichnet. Dabei war ersichtlich, dass die Kristallisation wirkstoffbeladener Trimyristintröpfchen bei niedrigeren Temperaturen begann („Onset“) als die wirkstofffreier (Abbildung 4-36). Offenbar senkten inkorporierte und/oder grenzflächenassoziierte Wirkstoffmoleküle die Onset-Temperatur  $T_c$  für die Lipidkristallisation (Tabelle 4-7). Die vorliegende Datenreihe enthielt nur Ergebnisse für eine Wirkstoffkonzentration pro Emulsionströpfchengröße. Um eine Korrelationen zwischen Wirkstoffkonzentration, Partikelgröße und Absenkung der Onset-Temperatur für die Lipidkristallisation  $\Delta T$  zu identifizieren, wären umfangreichere Untersuchungen notwendig gewesen. Mit einer ähnlichen Aufgabenstellung untersuchte Urška Treiber in ihrer Diplomarbeit eine poloxamerstabilisierte Trimyristinemulsion mit einem z-Average-Durchmesser von etwa 150 nm. Sie belud die Emulsion passiv mit Betamethasonvalerat, CURC, Diazepam, FENO oder PROP und konnte einen linearen Zusammenhang zwischen der Wirkstoffkonzentration und  $\Delta T$  zeigen [217].



**Abbildung 4-36:** Thermogramme der unbeladenen und beladenen Nanoemulsion E50. Die Emulsion war auf 1,6% Poloxamer in der wässrigen Phase und auf einen normierten Wärmefluss von etwa 1,5 J/g für die Trimyristinkristallisation eingestellt worden. Die Emulsionen mit Curcumin (CURC), Mefenaminsäure (MEF) und Porphyrin (PORPH) wurden von 20°C abwärts gekühlt, was zu den ersichtlichen Einschwingphänomenen in den Kurven führte. Die Emulsionen mit Amphotericin B (AMPHO), Fenofibrat (FENO) sowie ohne Beladung wurden auf 80°C erhitzt und anschließend abgekühlt. Die PORPH-beladene Emulsion wurde vor dem zweiten Filtrationsschritt untersucht. Die Pfeile geben die Richtung des Temperaturregimes an.



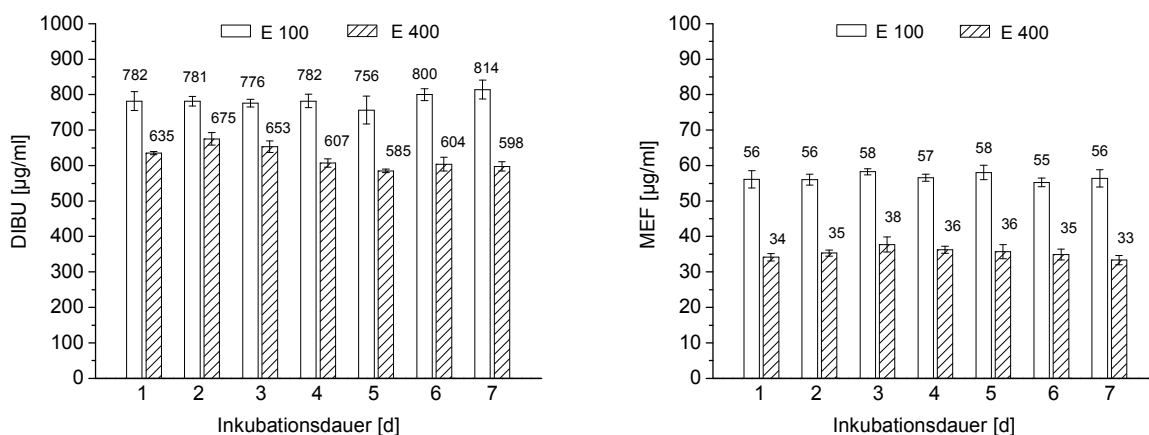
**Tabelle 4-7:** Onset-Temperaturen  $T_c$  der Kristallisationseignisse unbeladener und beladener Emulsionen.  $\Delta T$  bezeichnet die Differenz zwischen den  $T_c$ -Werten der beladenen und unbeladenen Proben. Jede Probe wurde doppelt vermessen, d.h.  $n=2$  für unbeladene und  $n=4$  für beladene Emulsionen. Keine Standardabweichung lag über 4%.

	AMPHO	CURC	FENO	MEF	PORPH
<i>E50: <math>T_c = 11,1^\circ\text{C}</math></i>					
Beladung [%]	0,61	2,72	4,84	0,72	15,80
$T_c$ [ $^\circ\text{C}$ ]	10,5	9,3	9,1	9,4	9,1
$\Delta T$ [ $^\circ\text{C}$ ]	0,5	1,7	2,0	1,7	2,0
<i>E100: <math>T_c = 11,5^\circ\text{C}</math></i>					
Beladung [%]	0,17	1,25	4,48	0,30	7,61
$T_c$ [ $^\circ\text{C}$ ]	11,1	10,2	10,0	9,8	10,0
$\Delta T$ [ $^\circ\text{C}$ ]	0,4	1,4	1,5	1,8	1,6
<i>E200: <math>T_c = 12,3^\circ\text{C}</math></i>					
Beladung [%]	-	-	4,26	0,19	-
$T_c$ [ $^\circ\text{C}$ ]	-	-	10,5	10,5	-
$\Delta T$ [ $^\circ\text{C}$ ]	-	-	1,8	1,8	-
<i>E400: <math>T_c = 12,4^\circ\text{C}</math></i>					
Beladung [%]	-	-	3,23	0,06	-
$T_c$ [ $^\circ\text{C}$ ]	-	-	11,0	10,8	-
$\Delta T$ [ $^\circ\text{C}$ ]	-	-	1,4	1,6	-

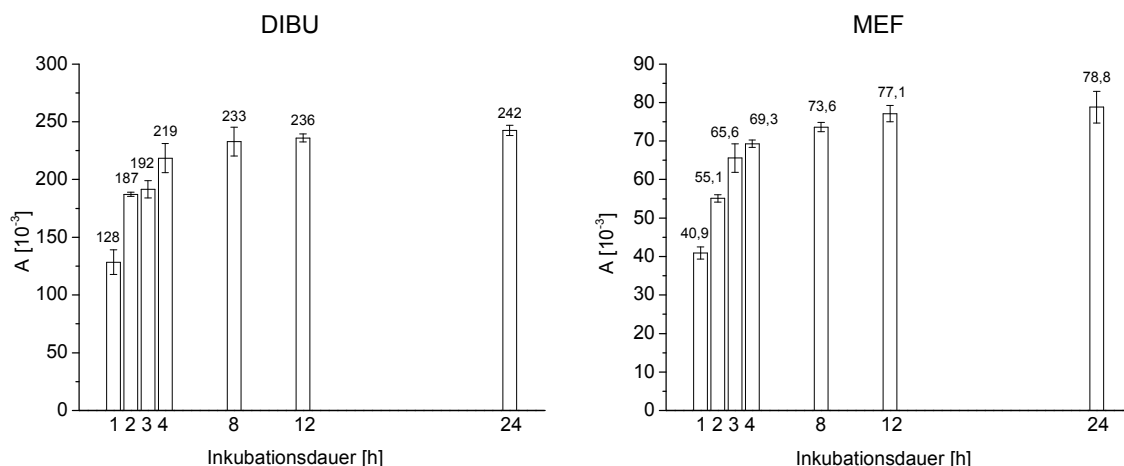
## 4.4 Geschwindigkeit und mechanistische Aspekte der passiven Beladung

### 4.4.1 Geschwindigkeit

Mit Hilfe der passiven Beladung soll möglichst die maximal erzielbare Konzentration eines Wirkstoffs in einem Trägersystem bestimmt werden. Deshalb muss mit einiger Sicherheit davon ausgegangen werden können, dass die Beladung innerhalb des gewählten Inkubationszeitraumes beendet wurde. Im Vorfeld der Experimente zur Wirkstofflokalisierung wurden exemplarisch die Konzentrationen von DIBU und MEF in Trimyristinemulsionen mit Inkubationsdauern zwischen ein und sieben Tagen untersucht. Um etwaige Effekte der Tröpfchengröße feststellen zu können, wurden als Systeme die E100 und die E400 ausgewählt. Die pH-Werte der Proben betrugen nach der Inkubation: MEF/E100 2,6 – 2,7; MEF/E400 2,6 – 2,7; DIBU/E100 10,3 – 10,5 und DIBU/E400 10,5 – 10,7. Bei beiden Wirkstoffen und beiden Tröpfchengrößen ist kein Anstiegstrend der Wirkstoffkonzentration im Verlauf der sieben Tage zu erkennen (Abbildung 4-37). Eventuell könnte bei E400 an Tag 2 (DIBU) beziehungsweise Tag 3 (MEF) ein Maximum der Beladung herausgelesen werden. Dies könnte aus einer Überladung und anschließender Rekristallisation resultieren. Vermutlich ist der Konzentrationsunterschied aber unter Beachtung der Standardabweichung statistisch nicht signifikant (Test nicht durchgeführt). Zusammenfassend ist zu sagen, dass unabhängig von der Emulsionströpfchengröße die Beladung nach 24 Stunden im Wesentlichen abgeschlossen war. Die Versuche wurden daher mit der E100 für Inkubationsdauern zwischen einer und 24 Stunden wiederholt. Die pH-Werte der Proben



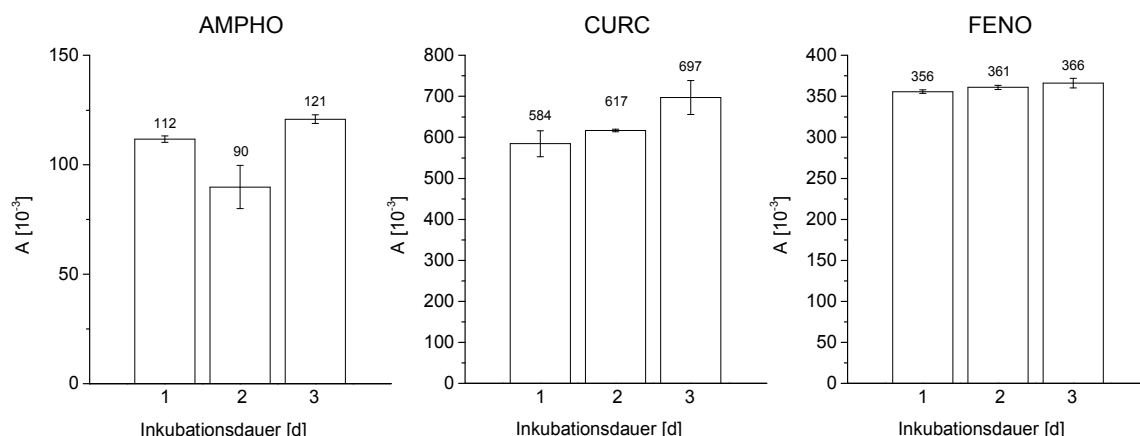
**Abbildung 4-37:** Erzielter Wirkstoffgehalt in Nanoemulsionen unterschiedlicher Partikelgröße in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Links: Dibucain (DIBU), rechts: Mefenaminsäure (MEF). Der Wirkstoffgehalt bezieht sich auf die Gesamtdispersion. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben,  $n=4$ .



**Abbildung 4-38:** Erzielter Wirkstoffgehalt von Dibucain (DIBU) und Mefenaminsäure (MEF) in der Nanoemulsion E100 in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Als Maß für den Wirkstoffgehalt ist die UV-spektrometrische Absorption der aufbereiteten Dispersionen auf der y-Achse aufgetragen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben,  $n=4$ .

betragen nach der Inkubation: MEF/E100 2,5 – 2,6 sowie DIBU/E100 10,7 – 10,8. Wenn man die Wirkstoffkonzentration nach eintägiger Inkubation als maximale Beladung auffasst, so war diese bei beiden Wirkstoffen bereits nach einer Stunde zur Hälfte erreicht (Abbildung 4-38). In Anbetracht der schlechten Löslichkeit von DIBU und MEF in der wässrigen Phase ( $c_{\text{MEF}} = 9 \mu\text{g/ml}$ ,  $c_{\text{DIBU}} = 32,2 \mu\text{g/ml}$ , Abbildung 4-26) war dieses Ergebnis recht überraschend. Offensichtlich erfolgte die Gleichgewichtseinstellung zwischen den Kompartimenten kristalliner Wirkstoff, wässrige Wirkstofflösung und Wirkstoff-Dispersionspartikel-Assoziat sehr zügig.

Wie genau die Beladung auf molekularer Ebene abläuft, ist noch nicht geklärt. Es ist sowohl vorstellbar, dass der Wirkstoff zunächst durch die wässrige Phase diffundieren muss als auch, dass er durch direkten physischen Kontakt mit den Dispersionspartikeln in Wechselwirkung tritt. Aus den Ergebnissen wurde abgeleitet, die Proben für die Untersuchungen zur Wirkstofflokalisierung jeweils 24 Stunden lang zu inkubieren. Die Annahme, dass die Beladung dann in allen Proben weitestgehend abgeschlossen ist, ist selbstverständlich vereinfacht. Es ist davon auszugehen, dass die Beladungsgeschwindigkeit – unter anderem – vom Wirkstoff und dem Trägersystem abhängt. Für AMPHO, CURC und FENO sind nach den Untersuchungen zur Wirkstofflokalisierung noch die Beladungsgeschwindigkeiten mit der E50 abgeschätzt worden. Bei allen drei Substanzen zeigte sich, dass die Beladung im Wesentlichen innerhalb von 24 Stunden abläuft (Abbildung 4-39). Am eindeutigsten stellte sich die Situation für Fenofibrat dar. Für diesen Wirkstoff war die Beladung sicher nach einem Tag abgeschlossen. Die Konzentration AMPHO unterlag einer Schwankung an Tag 2 mit relativ hohen Standardabweichungen und wies einen etwas höheren Wert an Tag 3 auf. Insgesamt sah es jedoch so aus, als sei auch bei AMPHO die



**Abbildung 4-39:** Erzielter Wirkstoffgehalt von Amphotericin B (AMPHO), Curcumin (CURC) und Fenofibrat (FENO) in der Nanoemulsion E50 in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Als Maß für den Wirkstoffgehalt ist die UV-spektrometrische Absorption der aufbereiteten Dispersionen auf der y-Achse aufgetragen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben,  $n=4$ .

Beladung nach einem Tag abgeschlossen. Lediglich bei CURC schien der Wirkstoffgehalt an Tag 3 tatsächlich nochmals angestiegen zu sein. Die Standardabweichungen waren allerdings an Tag 1 und 2 relativ hoch. Der Wert an Tag 1 betrug 83,8 % des Endwertes an Tag 3. Eine Wiederholung mit höherer Stichprobenzahl wäre für CURC in Betracht zu ziehen. Für PROP wurde der Versuch auf Grund der ohnehin sehr hohen Beladung nicht durchgeführt, bei PORPH wurde wegen der Präzipitationsproblematik (4.3.8) darauf verzichtet.

#### 4.4.2 Überlegungen zum Mechanismus der passiven Beladung

Das Lösen im flüssigen Bulk lipid gilt als Standardmethode (klassische Beladung) für die Herstellung beladener Nanoemulsionen oder –suspensionen. Es stellt sich die Frage, unter welchen Bedingungen der Wirkstoffeintrag auch mit der passiven Beladung gelingt. Grundsätzlich muss ein Wirkstoff für die Solubilisierung durch Lipidnanopartikel in der Lipidmatrix löslich sein oder/und eine Grenzflächenaktivität an der Partikeloberfläche aufweisen. Diese Voraussetzung gilt unabhängig davon, auf welche Art der Wirkstoff in die Dispersion eingetragen wird.

Die Interaktion eines kristallinen Wirkstoffs mit dem Lipid wird bei der klassischen Beladung dadurch initiiert, dass er direkt ins Bulk lipid gegeben wird. Diese Dispersion wird anschließend gerührt, um sie in eine Lösung zu überführen. Bei der passiven Beladung ist das Lipid bereits in der wässrigen Phase dispergiert und von einer Stabilisatorhülle umgeben. Die Interaktionsmöglichkeit des Wirkstoffs mit dem Lipid ist unter diesen Umständen auf zweierlei Arten denkbar. Die Beladung könnte (a) diffusionsvermittelt geschehen. Dazu müsste sich der Wirkstoff zunächst lösen, dann durch die wässrige Phase zum Partikel diffundieren sowie schließlich mit der Grenzfläche interagieren. Gegebenenfalls würde sich

ein zweiter Diffusionsschritt in die Partikelmatrix hinein anschließen. Andererseits (b) wäre es vorstellbar, dass durch direkten Kontakt mit einem Partikel Wirkstoffmoleküle aus ihrem Kristallverband herausgelöst werden. Dazu müsste sich der Wirkstoff aber gewissermaßen in den Stabilisatormolekülen lösen. Auch eine Kombination beider Mechanismen ist denkbar. Wenn ein Wirkstoff mindestens eine der beiden oben aufgeführten Voraussetzungen erfüllt, sollte eine passive Beladung prinzipiell immer möglich sein. Unter Umständen könnten die postulierten Prozesse allerdings so langsam ablaufen, dass die passive Beladung für die praktische Anwendung nicht geeignet ist. Interessant wäre nun, welches die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte und welche physikochemischen Eigenschaften der Wirkstoffe relevant sind.

#### Fall a) diffusionsvermittelte Beladung

Hier spielen die Auflösungsgeschwindigkeit und die Diffusionsgeschwindigkeit in der wässrigen Phase eine Rolle. Die Lösungsgeschwindigkeit einer Substanz in einem Lösungsmittel lässt sich mit der Noyes-Whitney-Gleichung beschreiben (Gleichung 2).

$$\frac{dc}{dt} = \frac{DA(c_s - c_x)}{h} \quad [\text{Gleichung 2}]$$

Hierbei ist  $dc/dt$  die Lösungsgeschwindigkeit,  $A$  die Feststoffoberfläche,  $D$  der Diffusionskoeffizient,  $c_s$  die Sättigungskonzentration des Feststoffs,  $c_x$  die Konzentration im Lösungsmittel zum Zeitpunkt  $t$ ,  $h$  die Diffusionsschichtdicke und  $(c_s - c_x)/h$  der Konzentrationsgradient. Der Diffusionskoeffizient seinerseits lässt sich mit der Stokes-Einstein-Gleichung definieren (Gleichung 3). Hierbei ist  $D$  der Diffusionskoeffizient,  $k_B$

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad [\text{Gleichung 3}]$$

die Boltzmannkonstante,  $T$  die absolute Temperatur,  $\eta$  die dynamische Viskosität des Diffusionsmediums und  $r$  der hydrodynamische Radius des diffundierenden Teilchens beziehungsweise Moleküls.

Über die Variation der beteiligten Größen wäre es theoretisch möglich, genauere Kenntnisse über den Ablauf der Beladung zu gewinnen. Da der Diffusionskoeffizient in Gleichung 2 eingeht, lässt sich der Einfluss der Lösungsgeschwindigkeit und der Diffusionsgeschwindigkeit in der wässrigen Phase nicht über die Variation von  $T$  oder  $\eta$  differenzieren. Wenn allerdings die Lösungsgeschwindigkeit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, so sollte dies über eine Variation von  $A$  nachweisbar sein. Beim Vergleich von grobpartikulärem und mikronisiertem, besser noch nanovermahlenem, Wirkstoff sollte die Verwendung kleinerer Partikel zu einer schnelleren

Beladung führen. Erste Versuche in der Arbeitsgruppe bestätigen diese Annahme (persönliche Kommunikation Katrin Göke). Die Diffusionsschichtdicke  $h$  und damit der Konzentrationsgradient kann durch die Art (Horizontalschüttler, Rotator) und Geschwindigkeit der Durchmischung der Probe verändert werden. Allerdings würde das auch Auswirkungen auf den Diffusionsstrom eines Moleküls haben. Er ist im 1. Fick'schen Diffusionsgesetz beschrieben (Gleichung 4). Hierbei ist  $J$  der Diffusionsstrom (Flux),  $D$  wieder der Diffusionskoeffizient und  $dc/dx$  der Diffusionsgradient des diffundierenden

$$J = -D \frac{dc}{dx} \quad [\text{Gleichung 4}]$$

Teilchens. Vorstellbar wäre noch, den Einfluss der Diffusionsgeschwindigkeit zu untersuchen, indem man die Lipidnanopartikel mit einer hydrophilen, hochviskosen Hülle umgibt. Der Diffusionskoeffizient wäre damit nicht in der wässrigen Phase, sondern nur unmittelbar um den Partikel erhöht und die Lösungsgeschwindigkeit des Wirkstoffs in der wässrigen Phase wäre nicht beeinträchtigt. Lipidnanodispersionen sind bereits erfolgreich in Alginatgele eingeschlossen worden [63].

Voraussetzung für aussagekräftige Experimente ist, dass die erzeugten Effekte sich in zeitlich ausreichend auflösbaren Größenordnungen bewegen.

#### **Fall b) kontaktvermittelte Beladung**

Wenn der Wirkstoff durch physischen Kontakt mit dem Partikel eine Interaktion eingeht, müsste die Beladungsgeschwindigkeit von der insgesamt angebotenen Partikeloberfläche abhängen. Beispielsweise hat die Emulsion E100 eine dreifach so hohe spezifische Oberfläche wie die E400. Die Anzahl der Partikel ist 64 mal so groß. Damit ist auch der mittlere Weg zwischen einem Partikel und einem Wirkstoffkristall kürzer und die Wahrscheinlichkeit eines Kontaktes höher. Im Fall von MEF und DIBU waren jedoch für die untersuchten Inkubationsintervalle keine Unterschiede in der Beladungsgeschwindigkeit zwischen E100 und E400 sichtbar (Abbildung 4-37). Falls der physikalische Kontakt Einfluss auf die Beladungskinetik hat, müssten dafür Inkubationszeiten von weniger als 24 Stunden untersucht werden.

Unter der Annahme, dass Fall a der vorherrschende Mechanismus bei der passiven Beladung ist, lassen sich Überlegungen anstellen, wodurch unterschiedliche Beladungskinetiken für unterschiedliche Wirkstoffe bedingt sein können. Laut Gleichung 3 ist  $r$  die einzige Größe, die bei verschiedenen Wirkstoffen zu verschiedenen Diffusionskoeffizienten führen kann. Da allerdings nur kleine Moleküle, das heißt keine Proteine oder Polymere, untersucht wurden, ist fraglich, ob die Molekülgröße einen Einfluss

hat, der messbar ist. Die größte Differenz der topologischen Moleküldurchmesser<sup>5</sup> besteht zwischen PROP mit 6 Bindungslängen und AMPHO mit 25 Bindungslängen (berechnet mit ChemBio3D Ultra 13.0). Das entspricht etwa einem Unterschied von Faktor 4. Zwischen DIBU und MEF besteht ein Unterschied von Faktor 1,75; bei Inkubationsintervallen von einem Tag und mehr war für die beiden Substanzen keine abweichenden Beladungsgeschwindigkeiten erkennbar.

Relevante Unterschiede sind allerdings beim Ausdruck  $(c_s - c_x)$  aus Gleichung 2 wahrscheinlich. Als ein Hinweis auf eine schlechte Wasserlöslichkeit von Wirkstoffen wird häufig der logP herangezogen. Definitionsgemäß handelt es sich dabei aber um einen Verteilungskoeffizienten, so dass er nichts über die absoluten Löslichkeiten in den beiden Phasen aussagt. Zwei Stoffe mit gleichem logP können demnach sehr wohl unterschiedlich gut in Wasser löslich sein. Unter diesem Gesichtspunkt sind MEF und DIBU ausgewählt worden (siehe 4.3.3). Entsprechend dem Ausdruck  $(c_s - c_x)$  aus Gleichung 2 hätte vermutet werden können, dass die Beladung für DIBU ( $L_{\text{DIBU}} = 14 \mu\text{g/ml}$ ) schneller verläuft als für MEF ( $L_{\text{MEF}} = 0,0442 \mu\text{g/ml}$ ). Das trifft nicht zu, denn nach einer Stunde beträgt die Konzentration an DIBU 53 % des 24-Stunden-Wertes und die von MEF 52 %. Als Erklärungsansatz ist die „reale“ Löslichkeit beider Stoffe in der wässrigen Phase denkbar. Trotz hoher Standardabweichungen unterscheidet sich diese im Gegensatz zur Löslichkeit in Wasser nicht mehr um drei Zehnerpotenzen (Tabelle 3-2 und Abbildung 4-26). Es wäre demnach interessant, das Experiment mit zwei Wirkstoffen zu wiederholen, die gleiche logP-Werte und deutlich unterschiedliche Löslichkeiten in der tatsächlichen wässrigen Phase der Dispersion besitzen. Für die anderen Wirkstoffe wurde die Beladungsgeschwindigkeit nicht so detailliert untersucht. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass beispielsweise Diazepam ( $\log P = 2,8$ ;  $L_{\text{Wasser}} = 51 \mu\text{g/ml}$ , [218]) innerhalb von sechs Stunden die maximale Konzentration in einer Emulsion erreicht [217]. Fenofibrat ( $L_{\text{Wasser}} = 1,1 \mu\text{g/ml}$ , Tabelle 3-2) brauchte dazu eher 24 Stunden. Ubidecarenon ( $\log P = 19,1$ ;  $L_{\text{Wasser}} = 5,9 \cdot 10^{-5} \mu\text{g/ml}$ , [218]) und Retinylpalmitat ( $\log P = 14,3$ ;  $L_{\text{Wasser}} = 7,9 \cdot 10^{-4} \mu\text{g/ml}$ , [218]) hingegen konnten auch innerhalb mehrerer Tage nicht erfolgreich in eine Dispersion eingebracht werden, obwohl sie sehr lipophil sind [10]. Diese Substanzen besitzen allerdings sehr viel geringere Wasserlöslichkeiten als die hier verwendeten (vergleiche Tabelle 3-2).

---

<sup>5</sup> Längste Ausdehnung eines Moleküls. Der Radius entspricht nicht unbedingt genau dem halben Wert.

## 5 Abschlussdiskussion

### 5.1 Passive Beladung

#### 5.1.1 Grundlagen

Es war mit allen acht untersuchten schwer wasserlöslichen Substanzen möglich, kolloidale lipidbasierte Trägerpartikel passiv zu beladen. Selbst wenn aber eine Substanz grenzflächenaffin oder lipophil ist, scheint das keine hinreichende Voraussetzung für das Gelingen einer passiven Beladung zu sein. Beispielsweise sind Ubidecarenon und Retinylpalmitat zwei Wirkstoffe, die lipophil sind und sich durch *De-novo*-Herstellung gut in Lipidnanodispersionen einarbeiten lassen [9,11]. Bei der passiven Beladung hingegen war kaum Wirkstoff in den Dispersionen nachweisbar [10]. In solchen Fällen würde die passive Beladung als Screening-Methode zur Identifikation geeigneter Trägersysteme versagen. Es stellt sich daher die Frage, wie genau die Beladung abläuft, von welchen Größen sie abhängt und welche dieser Größen vorteilhaft beeinflusst werden können.

Aus den theoretischen Überlegungen heraus erscheint es plausibel, dass für die Geschwindigkeit der passiven Beladung Auflösung, Löslichkeit und Diffusion des Wirkstoffs relevant sind (4.4.2). Physikalische Größen, die bei diesen Prozessen eine Rolle spielen und sich eignen, den Ablauf der passiven Beladung zu beleuchten, sind die spezifische Oberfläche des eingesetzten Wirkstoffs  $A$  und die dynamische Viskosität  $\eta$  des Dispersionsmittels. Damit aber nur die Diffusion, nicht jedoch die Auflösung, beeinflusst wird, dürfte  $\eta$  nur in unmittelbarer Umgebung des Lipidpartikels verändert werden. Denkbar ist dafür beispielsweise eine Art Polymerumhüllung, deren Viskosität noch durch den Polymergehalt variiert werden könnte. Ebenfalls eine Rolle spielt die Löslichkeit einer Substanz in der wässrigen Phase. Je größer sie ist, um so höher ist die Lösungsgeschwindigkeit (siehe 4.4.2, Gleichung 2). Bei dissoziierbaren Molekülen lässt sich die Löslichkeit leicht über den pH-Wert und damit den Dissoziationsgrad verändern. Gleichzeitig ändert sich jedoch auch der  $\log P$ , von dem nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch er einen Einfluss auf die Beladungskinetik hat. Für nicht dissoziierbare Moleküle lässt sich die Löslichkeit nicht sinnvoll verändern. Aus diesem Grund bietet es sich an, zwei Wirkstoffe mit ähnlichem  $\log P$ , aber unterschiedlichen Löslichkeiten in der wässrigen Phase der Dispersion zu vergleichen. Dieser Versuch wurde mit DIBU und MEF gemacht. Die der Literatur entnommenen Löslichkeiten in Wasser waren sehr unterschiedlich, aber die realen Löslichkeiten wurden in der tensidhaltigen wässrigen Phase nahezu nivelliert. Möglicherweise ist deshalb für das kleinste untersuchte Inkubationsintervall von einer Stunde kein Unterschied in der prozentualen Gesamtbeladung sichtbar geworden. Um eine bessere



zeitliche Auflösung zu erreichen, wären möglicherweise Wirkstoffe geeignet, deren Werte für die Löslichkeit in der wässrigen Phase zwischen denen der bisher untersuchten Substanzen und Ubidecarenon liegen. Das könnten beispielsweise sein: Amiodaron ( $\log P = 7,8$ ;  $L_{\text{Wasser}} = 4,9 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ , [101]), Thioridazin ( $\log P = 5,9$ ;  $L_{\text{Wasser}} = 2,6 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ , [101]) und Clofazimin ( $\log P = 7,5$ ;  $L_{\text{Wasser}} = 1,7 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ , [101]). Die realen Löslichkeiten in der tensidhaltigen wässrigen Phase sollten im Vorfeld bestimmt werden.

Neben Emulsionen sollten auch Suspensionen in die Untersuchungen zur Beladungskinetik einbezogen werden. Unter der Annahme, dass lipophile Wirkstoffe nicht in das Kristallgitter fester Lipidnanopartikel einwandern, müsste die Beladung in Suspensionen theoretisch schneller abgeschlossen sein als in Emulsionen. Bei Emulsionen würde sich nach dem Kontakt des Wirkstoffmoleküls mit der Tröpfchenoberfläche noch die Diffusion in die flüssige Partikelmatrix anschließen. Fraglich ist, ob sich diese Diffusion in einem zeitlichen Rahmen bewegt, der experimentell sichtbar gemacht werden kann.

Bei Substanzen, die einen moderaten Zeitraum von mehreren Tagen für die Beladung benötigen, wäre eventuell die Untersuchung kolloidaler Zusatzstrukturen interessant. Die Trimyristindispersionen in dieser Arbeit waren bewusst so konzipiert, dass keine Mizellbildung zu erwarten war. Interessant wäre zu untersuchen, inwiefern Mizellen oder auch Cyclodextrine eine Art Carrier-Funktion übernehmen könnten, um die passive Beladung zu beschleunigen.

Ein wichtiger Aspekt ist in dieser Arbeit experimentell noch unberücksichtigt geblieben: entspricht die durch die passive Beladung ermittelte Beladungskapazität der, die auch bei der *De-novo*-Herstellung erzielt würde? Aus thermodynamischer Sicht sollte das der Fall sein, wenn beide Dispersionen, unabhängig vom Wirkstoff, identisch sind. Von Bedeutung ist dabei nicht nur die Zusammensetzung, sondern auch die Partikelgröße, die einen Einfluss auf die Beladungshöhe haben kann (4.3.8.2). Die Beladung in der Gesamtdispersion setzt sich zusammen aus den Wirkstoffanteilen in den Partikeln, an den Partikelgrenzflächen, in der wässrigen Phase und in kolloidalen Zusatzstrukturen, die gegebenenfalls von überschüssigem Stabilisator gebildet werden können. Wenn sich alle Verteilungsgleichgewichte zwischen diesen Kompartimenten ausgebildet haben, sollte die Beladung einer Dispersion unabhängig von ihrem Herstellungsprozess sein. Es ist jedoch vorstellbar, dass unterschiedliche Beladungsmengen ermittelt werden, weil sich je nach Wirkstoff und Dispersion Verteilungsgleichgewichte sehr langsam einstellen könnten. Der zeitliche Aspekt dürfte auch bei vergleichenden Untersuchungen zur Lokalisation von Fremdmolekülen in Lipidnanopartikeln eine Rolle spielen [62,142] und wird auf Seite 115 diskutiert.

Es wäre wünschenswert, aus den theoretischen Überlegungen und praktischen Ergebnissen Vorhersagen über die Geschwindigkeit und den Umfang der passiven Beladung machen zu

können. Einerseits wäre dazu eine höhere Anzahl untersuchter Wirkstoffe vorteilhaft. Andererseits wäre die Einbeziehung (selbst) praktisch ermittelter Werte für Löslichkeiten, Lösungsgeschwindigkeiten und Verteilungskoeffizienten hilfreich. Aus der Literatur entnommene Werte haben aus verschiedenen Gründen nur eine eingeschränkte Aussagekraft. Es handelt sich häufig um berechnete Werte, die erheblich von den realen Werten abweichen können. Die Entwicklung von Vorhersagemodellen für physikochemische Größen ist eine Herausforderung [171]. Bei praktischen Werten spielen die exakten Details der Bestimmung eine große Rolle. Dazu zählen unter anderem die Ermittlungsmethode, Äquilibrationszeiten, pH-Wert, Temperatur oder die eingesetzte Modifikation einer Substanz. Schließlich ist auch der Verteilungskoeffizient zwischen Wasser und Octanol nicht der gleiche wie beispielsweise zwischen Wasser und MCT und die Löslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit in einer Tensidlösung unterscheiden sich von denen in Wasser.

### 5.1.2 Anwendung

Für die Formulierung von KuRei300 wurde die passive Beladung nicht nur als Screening-Instrument, sondern auch als Herstellungsmethode genutzt. Weniger als 400 mg KuRei300 wurden benötigt, um alle Experimente einschließlich der Erstellung von Kalibriergeraden und Stabilitätsuntersuchungen durchzuführen. Es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass sich bei einer *De-novo*-Herstellung nicht auch eine kolloidale Lipidemulsion in der Art von Lipofundin® als geeigneter Träger hätte erweisen können [9,10]. Da aber beispielsweise bei Mischmizellen die Beladung nach 12 Stunden beendet war (Abbildung 4-13) ist das wenig wahrscheinlich. Durch die begrenzte Menge von KuRei300 waren *De-novo*-Herstellungen ohnehin keine Option und ohne die Nutzung der passiven Beladung hätte die Substanz vermutlich überhaupt nicht akzeptabel formuliert werden können. Unter ähnlichen Rahmenbedingungen ist die passive Beladung also durchaus ein nützliches Instrument für die Formulierung.

Aus den in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnissen lassen sich Überlegungen für das künftige Vorgehen bei einer solchen Aufgabenstellung ableiten. Günstig ist die Verwendung von möglichst kleinpartikulären Dispersionen. Das führt einerseits *per se* zu einer höheren Beladung und erlaubt andererseits den Verzicht auf die Herstellung von Beschichtungen und deren physikochemische Charakterisierung. Überschüssiger Wirkstoff kann unkompliziert durch Spritzenvorsatzfilter abgetrennt werden. Die Trimyristindispersionen E50, E100 und S50 beispielsweise waren durch Membranfilter der Porengröße 0,22 µm filtrierbar<sup>6</sup> und S100 durch 0,45 µm. Auch Liposomen lassen sich mit Größen um 100 nm und kleiner erzeugen; Mischmizellen passieren ohnehin problemlos Sterilfilter. Bei Verwendung derart kleinpartikulärer Systeme besteht außerdem Potential für weitere Miniaturisierung der

---

<sup>6</sup> Für die Experimente wurden für S50 jedoch 0,45 µm verwendet.

passiven Beladung beispielsweise mit Mikrotiterplatten (siehe weiter unten). Als ein Standardsystem wären die Trimyristin-Poloxamer-Dispersionen denkbar. Einerseits kann eine Substanz mit der Emulsion auf ihre Affinität zu Triglyceriden und andererseits mit der Suspension auf ihre Grenzflächenaffinität geprüft werden. Die in dieser Arbeit verwendete Emulsion E100 hatte sich qualitativ auch nach 15 Monaten nicht verschlechtert (Z-Average-Durchmesser 114 nm; Pdl 0,056), die E50 wies einen etwas vergrößerten Pdl auf (Z-Average-Durchmesser 50 nm; Pdl 0,141; Ausgangswerte in Abbildung 4-20). Somit lassen sich diese Dispersionen gut vorrätig halten. Auch Liposomen sind ein günstiges Testsystem. Sie können in verschiedenen Größen erzeugt werden und die Herstellung einfacher Liposomen kann innerhalb kurzer Zeit und substanzsparend per Handextrusion erfolgen. Ebenso wie bei festen Lipidnanopartikeln sollte eine gute Beladungskapazität bei Liposomen auf einen amphiphilen Charakter eines Wirkstoffes hinweisen. Insofern wäre es interessant zu untersuchen, ob KuRei300 nicht nur von Liposomen, sondern auch von festen Lipidnanopartikeln solubilisiert wird. Mischmizellen aus Lecithin und Gallensalz brachten bei KuRei300 ähnliche Ergebnisse wie die Liposomen. Vorteilhaft bei diesem System ist die äußerst einfache Herstellungsweise, die keinerlei Expertise benötigt. Nachteilig ist die mehrtägige Herstellungsdauer und der sehr hohe Preis von Gallensalzen. Die unterkühlt-smektischen und kubischen Nanopartikel unterscheiden sich strukturell noch einmal stark von den bisher genannten und bereichern die Palette an Testsystemen. Für die unterkühlt-smektischen Nanopartikel wäre es lohnenswert, die Partikelgröße noch etwas zu reduzieren, um sie ebenfalls durch Filter der Porengröße 0,22 µm filtrieren zu können. Für das Vorrätighalten dieses Systems ist der Hinweis angebracht, dass die umfangreichsten Daten zur Stabilität für Lagertemperaturen von 23°C vorliegen [45,105]. Die kubischen Nanopartikel waren mit etwa 355 nm die mit Abstand größten untersuchten Partikel. Sinnvoll wäre auch hier eine Reduktion der Partikelgröße. Wenn das nicht möglich ist, müssen Beladungsexperimente auf Grund der Filterproblematik mit Wirkstoffbeschichtungen durchgeführt werden. Sollten sich die kubischen Nanopartikel dann als ein geeignetes Trägersystem herausstellen, müsste, zumindest bei parenteraler Anwendungsabsicht, die chemische und physikalische Stabilität der wirkstoffhaltigen Zubereitung nach Autoklavierung geprüft werden.

Obwohl die passive Beladung für Screening-Zwecke entwickelt wurde, könnte sie unter Umständen auch eine gute Alternative zur *De-Novo*-Herstellung wirkstoffbeladener kolloidaler Dispersionen sein. Die Voraussetzung dafür ist, dass die Beladung in einem für die Praxis angemessenen Zeitraum abgeschlossen ist. Gegenüber der klassischen Beladung weist die passive Beladung diverse Vorteile auf. So ist beispielsweise der Beladungsprozess vollkommen losgelöst vom Herstellungsprozess der Trägersysteme. Da kein Substanzkontakt zu Dispergierwerkzeugen, Homogenisatoren oder Extrudern besteht,

entfallen aufwendige Reinigungsarbeiten und es sind jegliche Cross-Kontaminationen ausgeschlossen. Zudem ist die Expertise für die Herstellung der Trägersysteme nicht mehr verknüpft mit der Einarbeitung des Wirkstoffs. Es können unkompliziert andernorts gefertigte oder kommerziell erhältliche Systeme verwendet werden. Auf der Suche nach einer kostengünstigen Alternative zu dem verhältnismäßig teuren liposomalen Produkt AmBisome® wurde bereits vor vielen Jahren beispielsweise AMPHO in parenterale Lipidemulsionen eingebracht und auch an Patienten getestet [219,220]. Die (physikalische) Stabilität der Zubereitungen war allerdings eine Herausforderung [221] und die aktuelle Literatur zeigt, dass sich dieser Ansatz offenbar nicht durchgesetzt hat.

Ein weiterer Vorteil der passiven Beladung ist die schonende Verarbeitung thermolabiler Substanzen, weil die Inkubation bei Raumtemperatur stattfinden kann. Bei der Beladung von Liposomen kann zudem der Einsatz organischer Lösungsmittel umgangen werden. Für die häufig verwendete Filmbildungsmethode werden schwer wasserlösliche Wirkstoffe sonst in der Regel gemeinsam mit den (Phospho)lipiden in organischer Lösung vorgelegt [91,133,135,136]. Erzeugt man die Liposomen nun beispielsweise durch Extrusion und belädt sie passiv, kann auf organische Lösungsmittel vollständig verzichtet werden.

Schon die in dieser Arbeit durchgeführte Form der passiven Beladung zeichnet sich durch die Verwendung relativ kleiner Volumina der Trägersysteme (< 2 ml) und geringer Wirkstoffmengen (wenigen Milligramm) für eine Probe aus. Das ist ideal für hochpreisige, schwer verfügbare oder (cyto)toxische Wirk- und auch Hilfsstoffe. Erste Ansätze für eine weitere Miniaturisierung wurden bereits vorgestellt, sollten aber weiter vorangetrieben werden, denn die geringe zur Verfügung stehende Substanzmenge ist eine der größten Herausforderungen in der frühen Entwicklung von Wirkstoffen [3]. Ein dafür interessantes Produkt ist beispielsweise Mini-UniPrep® von der Firma Whatman. Es handelt sich um ein Glasröhrchen, das mit 220-500 µl Probe befüllt werden kann. In diesem Röhrchen befindet sich ein Membranfilter, der erst zum Filtrationszeitpunkt kurzen Kontakt mit der Probe bekommt. Das Filtrat hat noch ein Volumen von etwa 50-300 µl. Die Filter sind mit Porengrößen von 0,2 µm und 0,45 µm und aus PTFE und PVDF erhältlich. Ein Vorgängerprodukt des hier beschriebenen wurde für Löslichkeitsbestimmungen verwendet [222].

Eine weitere zu testende Option sind Mikrotiterplatten (Wellplates). Sie sind in der Zellkultur weit verbreitet und insofern vorteilhaft, als dass sie für verschiedene halb- oder teilautomatisierte Vorgänge normiert sind. So können die Mulden (Wells) beispielsweise mit Mehrkanalpipetten automatisch oder händisch befüllt werden. Die Platten sind in unterschiedlichen Materialien - häufig beschichtet - und Muldengrößen sowie Muldenformen erhältlich. Platten mit 96 Mulden haben beispielsweise ein Arbeitsvolumen von etwa 200 µl pro Mulde. Die konkreten Anforderungen an die Platten hängen davon ab, ob die Beladung

exakt quantifiziert werden soll oder eine optische Einschätzung (vergleiche 4.1.4) ausreichend ist. Für die exakte Quantifizierung muss der Wirkstoff nach Ende der Inkubation abgetrennt werden. Dafür würden sich Platten eignen, bei denen der Boden der einzelnen Mulden aus Filtern besteht. Mit einer passenden Vakuumvorrichtung kann Unterdruck an die gesamte Platte angelegt und die Filtrate können in einer Art Drainageplatte („underdrain“) aufgefangen werden. Diese Systeme gibt es zum Beispiel von Millipore (Produktserie MultiScreen®, Millipore, USA) mit hydrophilen PTFE-Membranfiltern der Porengrößen 0,22 µm und 0,45 µm oder Glasfaserfiltern der Maschengrößen 1,0 und 1,2 µm. In der Literatur sind solche (halb)automatischen Screening-Ansätze bereits vorgestellt worden [155,223]. Bei größer partikulären Trägersystemen müsste auf die grobmaschigen Glasfaserfilter und somit auf Wirkstoffbeschichtungen zurückgegriffen werden. Dazu wiederum muss zunächst die Beständigkeit der Kunststoffplatten (häufig Polystyrol oder Polypropylen) für die verwendeten Lösungsmittel und anschließend die zufriedenstellende Abtrennung des Wirkstoffs nachgewiesen werden. Außerdem muss der physikalische Zustand des Wirkstoffs in der Beschichtung geprüft werden (4.2.5).

Für die optische Einschätzung des Solubilitätsvermögens eines Trägers müssten exakte Wirkstoffmengen in die Mulden vorgelegt werden (vergleiche 4.1.4). Da eine Mikrotiterplatte nicht auf einer Ultrafeinwaage platziert werden kann, geht dies nur wie bei den HPLC-Probengefäßen über volumetrische Dosierung einer Wirkstofflösung oder gegebenenfalls -suspension. Das wiederum zieht dann die Charakterisierung der entstandenen Beschichtung nach sich. Grundsätzlich gibt es aber Platten, die für die optische Beobachtung geeignet sind, weil sie einen dünnen Glasboden besitzen (z.B. von PAA, Cölbe, Deutschland). Reine Glasplatten (z.B. von Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) sind auf Grund der dicken Wand- und Bodenstärke nicht geeignet.

Unabhängig von der Art der Beladung demonstrieren die Ergebnisse im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Darreichungsform für KuRei300 eindrücklich, wie wichtig der Aspekt der chemischen Stabilität einer Formulierung auch in der frühen Entwicklungsphase eines Wirkstoffkandidaten ist. Die Substanz bot physikochemische Komplikationen in Form von Polymorphie sowie E-Z-Isomerisierung und beträchtlicher chemischer Zersetzung in Lösung.

## 5.2 Lokalisation von Wirkstoffen in flüssigen und festen

### Lipidnanopartikeln

Durch die Verwendung gut definierter Trimyristinnanodispersionen war es möglich, aus der Beladungshöhe Informationen über die Lokalisation der solubilisierten Wirkstoffe abzuleiten. Grundsätzlich kommen als Aufenthaltsort für Wirkstoffmoleküle in einer kolloidalen Lipidnanodispersion folgende Kompartimente in Frage: Matrix und Grenzflächen der Partikel, die wässrige Phase sowie zusätzliche kolloidale Strukturen wie (Misch)mizellen oder Liposomen, die von überschüssigem Stabilisator gebildet werden können. Im Folgenden soll zunächst nur die Assoziation zwischen Wirkstoff und Nanopartikel diskutiert werden. Die Bildung kolloidaler Zusatzstrukturen wurde in den hier aufgeführten Untersuchungen zur Wirkstofflokalisierung durch die Zusammensetzung der untersuchten Trimyristindispersionen umgangen und der Wirkstoffanteil in der wässrigen Phase durch einen Rechenschritt heraus korrigiert.

Die Trimyristinröpfchen der Nanoemulsionen solubilisierten Wirkstoffmoleküle sowohl in der flüssigen Matrix als auch an der Grenzfläche. Dieses Ergebnis fügt sich gut in die Literatur ein [51,58,62,132,147]. Bei Betrachtung einer konkreten Nanoemulsion hing die Wirkstoffverteilung zwischen diesen Kompartimenten vom jeweiligen Wirkstoff ab. Beispielsweise war von FENO ein höherer prozentualer Anteil in der Matrix gelöst als von MEF (Abbildung 4-29). Eine tiefergreifende Erklärung, warum eine bestimmte Substanz eine bestimmte Verteilung zeigt und daraus ableitbare Vorhersagen wären wünschenswert. Tatsächlich wurden physikochemische Deskriptoren wie der logP, der HLB und die molekulare Oberfläche für die Vorhersage der chromatographischen Retention von Wirkstoffen herangezogen [224]. Obwohl die Wirkstoff-Partikel-Assoziation nicht gänzlich mit der chromatographischen Retention vergleichbar ist, ist letztere doch ebenfalls ein grenzflächenvermitteltes Phänomen. Die erwähnten Deskriptoren könnten deshalb geeignet sein, um auch die Wirkstoff-Partikel-Interaktion zu beschreiben. Die Berechnung der Deskriptoren und die anschließende Modellierung der Wirkstoffassoziation stellen jedoch ein äußerst anspruchsvolles eigenes Forschungsgebiet dar und überschreiten den Rahmen der vorliegenden Arbeit. Trotzdem kann vermutlich davon ausgegangen werden, dass die Grenzflächenaktivität eines Moleküls, die durch das Vorhandensein von hydrophilen und hydrophoben Domänen geprägt wird, eine Rolle spielt. Die Tendenz, sich in Grenzflächen aufzuhalten, sowie die Löslichkeit im Matrixlipid werden das individuelle Verteilungsverhalten eines Wirkstoffs zwischen dem Inneren eines Emulsionströpfchens und seiner Oberfläche bestimmen. Berton-Carabin et al. fanden in einer Tetradecanemulsion eine lipophile Spinsonde zu 72 % im Lipid und zu 28 % in der wässrigen Phase, wohingegen eine amphiphile Sonde sich nur zu 25 % im Lipid, dafür aber zu 75 % in den Partikelgrenzflächen aufhielt [58].

Bei den kristallinen Trimyristinpartikeln in den Suspensionen scheinen sich die Wirkstoffmoleküle in der Partikelgrenzfläche aufzuhalten. Dieses Ergebnis stützt sich auf die Resultate für die Substanzen, bei denen keine „Unregelmäßigkeiten“ auftraten, nämlich CURC, DIBU, FENO und MEF. In diesen Fällen führte die Reduktion der Partikelgröße um die Hälfte stets zu einer Verdoppelung der Beladung. Da die Beladung auf die Lipidmasse bezogen wurde, impliziert dies, dass die erzielbare Wirkstoffkonzentration für eine gegebene Substanz lediglich von der Partikelgrenzfläche abhängt. Das ist plausibel, da es wenig wahrscheinlich ist, dass – insbesondere bei passiver Beladung – Wirkstoffmoleküle in das Lipidkristallgitter einwandern. Feste Trimyristinpartikel sind zudem sehr flache Plättchen, die nur wenige Molekülschichten dick sind und so wenig Platz für Fremdmoleküle bieten [206]. Etliche Autoren, die die Lokalisation von Wirkstoffen in festen Lipidnanopartikeln mit anderen Methoden analysierten, kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass sich die untersuchten Substanzmoleküle praktisch ausschließlich in der Grenzfläche befinden [51,58,62,132,146,147,150].

Es ist naheliegend, dass die absolute erzielbare Beladung für Lipidnanopartikel neben dem Matrixmaterial in erster Linie vom Wirkstoff abhängt. Mit den Trimyristindispersionen wurde gezeigt, dass sie für einen gegebenen Wirkstoff zudem stark vom physikalischen Zustand und der Größe der Partikel beeinflusst werden kann.

Wenn man die Partikel einer korrespondierenden Emulsion und Suspension vergleicht, geht beides miteinander einher. Die Kristallisation eines kugelförmigen Trimyristintröpfchens führt zwangsläufig zu einer vergrößerten Oberfläche, da die festen Partikel – je nach Größe – runde bis längliche Plättchen sind (Abbildung 4-21). Leider lässt sich die Größenordnung der Oberflächenzunahme auf Grund der irregulären Partikelform nicht ohne weiteres berechnen. Mit Ausnahme von AMPHO und CURC wurde der Effekt der vergrößerten Oberfläche in den Nanosuspensionen von der Löslichkeit im Kern der Emulsionströpfchen überlagert. Für die meisten Wirkstoffe aus der vorliegenden Arbeit sind daher Nanoemulsionen den Nanosuspensionen im Hinblick auf die erzielbare Beladung vorzuziehen. Es gab allerdings auch Wirkstoffe, bei denen die Suspensionen deutlich höher beladen waren als die Emulsionen, so dass die festen Partikel mit ihren größeren Grenzflächen die besseren Trägerpartikel sind. Diese Situation trifft zu für AMPHO und CURC und wurde auch für Betamethasonvalerat zuvor beschrieben [10]. Vermutlich ist dies darin begründet, dass diese Substanzen höchstens moderat löslich in Trimyristin, dafür aber recht amphiphil und somit grenzflächenaktiv sind. AMPHO und CURC beispielsweise besitzen die niedrigsten logP-Werte der untersuchten Verbindungen (Tabelle 3-2). Sowohl AMPHO als auch CURC können mit Hilfe von Liposomen solubilisiert werden [95,225], was ein Hinweis auf den amphiphilen Charakter dieser Moleküle ist. Insofern könnte vermutet werden, dass für liposomal solubilisierbare Wirkstoffe Trimyristinsuspensionen bessere Trägersysteme sind

als Trimyristinemulsionen. Zur Überprüfung dieser Annahme würden sich beispielsweise KuRei300 oder Verteporfin anbieten. Letzteres ist ein Porphyrinderivat, dass als liposomale Formulierung Visudyne® für die Therapie der altersbezogenen, feuchten Makuladegeneration zugelassen ist [4]. Für eine sinnvolle Interpretation der Daten wäre es wünschenswert, dass Verteporfin ein weniger komplexes physikochemisches Verhalten als PORPH hat (4.3.8.2).

Beim Vergleich von Emulsionen beziehungsweise Suspensionen jeweils unterschiedlich großer Partikelklassen, nahm die Beladung mit abnehmender Partikelgröße für die meisten Wirkstoffe zu. Eine zentrale Schlussfolgerung dieser Arbeit ist, dass kleinere Partikel höhere Beladungen erzielen, auch wenn es nicht möglich war, die zugrunde liegenden Mechanismen vollständig aufzuklären. Wenn die höchstmögliche Beladung angestrebt wird, sollten daher kleinstmögliche Partikel verwendet werden.

Ein besonderer Wert der mit den Trimyristindispersionen durchgeführten Beladungsstudien liegt darin, dass durch die verwendeten Methoden beliebige hydrophobe Substanzen einbezogen werden konnten und keine Beschränkung auf beispielsweise fluoreszierende oder spinaktive Modellmoleküle notwendig war. Dadurch konnten pharmazeutisch relevante Moleküle in realistisch hohen Konzentrationen untersucht werden. Das führte dazu, dass zwei Phänomene auftraten, die von praktischer Bedeutung für pharmazeutisch eingesetzte Lipidnanodispersionen sind. Zum einen zeigte PROP eutektisches Verhalten mit Trimyristin, das Veränderungen des physikalischen Zustands der Partikel in den beladenen Suspensionen hervorrief. Zum anderen traten in PORPH-beladenen Emulsionen Kristalle auf, die einer möglicherweise veränderten physikalischen Form von PROP zugeschrieben wurden. Besonders Letzteres ist ein anspruchsvolles Problem, das diverse Ursachen haben kann. Dazu zählen Übersättigung der Partikel mit anschließender Rekristallisation sowie die Bildung von Hydraten oder Wirkstoffmodifikationen mit verringerter Löslichkeit in der wässrigen Phase. Die Gefahr, dass die beschriebenen Komplikationen zum Tragen kommen, ist gering, wenn bei Lokalisationsstudien mit Methoden wie EPR-Spektroskopie oder Fluoreszenzspektroskopie Markermoleküle nur in sehr niedrigen Konzentrationen verwendet werden.

Neben der Zusammensetzung und dem physikalischen Zustand der Partikelmatrix sowie den Eigenschaften des Wirkstoffs kann auch der Stabilisator in einer Dispersion einen Einfluss auf die Wirkstofflokalisierung haben. Die untersuchten Trimyristindispersionen wurden mit Poloxamer 188 stabilisiert, um die möglichen Aufenthaltskompartimente für einen Wirkstoff auf Partikelmatrix, Partikelgrenzflächen und die wässrige Phase zu reduzieren. Durch die Einstellung auf 1,6 % freies Poloxamer in der wässrigen Phase waren keine Mizellen als zusätzliche solubilisierende kolloidale Strukturen zu erwarten. Parenterale kolloidale Lipidemulsionen werden aber in der Regel hauptsächlich mit Lecithin stabilisiert, so dass in diesen Systemen die Wirkstofflokalisierung von den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen



abweichen könnte. Yucel et al. fanden, dass die Lokalisation einer hydrophoben Spinsonde in einer *de-novo* beladenen Tetradecanemulsion vom verwendeten Emulgator abhing. In einer mit Lecithin und Gallensalz stabilisierten Emulsion befanden sich etwa 60 % der Spinsonde in der Ölphase, 20 % immobilisiert in Grenzflächen und 20 % in der wässrigen Phase. Wenn die Emulsion mit Casein stabilisiert war, hielten sich 70 % in der Ölphase, kein Anteil in den Grenzflächen und 30 % in der wässrigen Phase auf [226]. Besonders bei grenzflächenaktiven Substanzen ist eine Assoziation mit Lecithin in Form der Emulgatorhülle, aber auch in Form von Aggregaten und Vesikeln in der wässrigen Phase zu erwarten [227].

In einer weiteren Arbeit ermittelten die Autoren, dass die Wirkstofflokalisierung in einer beladenen Emulsion von der Herstellungsmethode abhängen kann [142]. Sie beluden eine mit Phospholipiden stabilisierte kolloidale Sojaölemulsion entweder *de-novo* oder passiv mit verschiedenen lipophilen Benzodiazepinen. Bei dem lipophilsten Derivat Diazepam war die Wirkstoffverteilung bei beiden Herstellungsmethoden gleich. Die Substanz befand sich überwiegend sowohl in der Ölphase und als auch in den phospholipidreichen Grenzflächen. Bei den weniger lipophilen Derivaten Alprazolam, Clonazepam und Lorazepam hingegen führte die *De-novo*-Herstellung verglichen mit der passiven Beladung zu mehr Wirkstoff in den phospholipidreichen Grenzflächen. Bei der passiven Beladung fand sich mehr Wirkstoff in der wässrigen Phase und in zusätzlichen kolloidalen Lecithinstrukturen. Außerdem war nach der passiven Beladung im Gegensatz zur *De-novo*-Herstellung kein Wirkstoff in der Ölphase nachweisbar. Vermutlich waren die Verteilungsgleichgewichte in den Emulsionen zum Zeitpunkt der Messungen noch nicht eingestellt gewesen, obwohl die Systeme erst sieben Tage nach der Herstellung untersucht wurden. Das zeigt noch einmal die Relevanz thermodynamischer Parameter für die passive Beladung, denn auch sieben Tage wären kein akzeptabler Zeitraum für den praktischen Einsatz. Finke et al. beluden feste und flüssige Lipidnanopartikel mit dem Fluoreszenzmarker Coumarin 6 sowohl *de-novo* als auch passiv. Bei den festen Partikeln führten beide Beladungsmethoden zur Lokalisation des Markermoleküls ausschließlich in den Partikelgrenzflächen [62]. Für die Emulsionströpfchen fanden die Autoren nach passiver Beladung verhältnismäßig mehr Coumarin 6 in den Partikelgrenzflächen als nach *De-novo*-Herstellung. Partikel, die *de-novo* beladen wurden, enthielten einen größeren Anteil des Coumarins in der Matrix. Angaben zum Zeitabstand zwischen der Herstellung der beladenen Dispersionen und ihrer Untersuchung machen die Autoren leider nicht.

Im Übrigen kann aus den genannten Studien leider keine Aussage über einen Unterschied in der absoluten Beladung getroffen werden, weil jeweils bei beiden Methoden die gleichen Mengen an Wirkstoff/Markermolekül zugesetzt wurden.

Insgesamt wäre es wünschenswert, die gefundenen Ergebnisse zur Wirkstofflokalisierung mit ergänzenden Untersuchungen zu untermauern. Denkbar sind hier Freisetzungsforschungen. Beispielsweise wäre anzunehmen, dass Wirkstoffmoleküle aus der flüssigen Lipidmatrix eines Emulsionströpfchens langsamer freigesetzt werden, als von einer Partikelgrenzfläche, weil ein zusätzlicher Diffusionsweg zurückgelegt werden muss. Die zeitliche Auflösung dieses Unterschieds ist möglicherweise eine Herausforderung.

.

## 6 Zusammenfassung

Ein Großteil neuer Wirkstoffe und Wirkstoffkandidaten ist schlecht wasserlöslich. Die Formulierung mit Hilfe lipidbasierter kolloidaler Dispersionen kann eine Möglichkeit zur Lösung dieses Problem sein. Eine Alternative zur *De-novo*-Herstellung solcher wirkstoffhaltigen Dispersionen ist die passive Beladung. Bei dieser Methode wird eine vorgefertigte Dispersion mit Wirkstoff im Überschuss versetzt und nicht solubilisierbare Reste werden anschließend entfernt.

Die vorliegende Arbeit befasste sich sowohl mit physikochemischen Grundlagen der passiven Beladung und also auch mit Aspekten der praktischen Anwendung. Es sollte eine Vorstellung davon entwickelt werden, welche Mechanismen der passiven Beladung zu Grunde liegen und welche Faktoren seitens des Wirkstoffs und der kolloidalen Dispersion sie beeinflussen. An Hand eines Dispersionssystems mit Trimyristin wurde zudem untersucht, wo sich Wirkstoffmoleküle bei flüssigen beziehungsweise festen Lipidnanopartikeln aufhalten. Darüberhinaus wurde die passive Beladung als Screening-Instrument für die Identifikation von Trägersystemen für hydrophobe Wirkstoffe in der frühen Entwicklungsphase evaluiert. In diesem Zusammenhang war es die Aufgabe, eine parenterale Darreichungsform für Tierstudien mit der antileishmaniellen Substanz KuRei300 zu entwickeln.

Ein wichtiger Schritt bei der passiven Beladung ist die Entfernung nicht solubilisierter Wirkstoffs nach der Inkubation. Um dabei auftretende Filtrationsprobleme zu beheben, wurden Wirkstoffbeschichtungen entwickelt. Sie konnten reproduzierbar erzeugt werden, indem organische Lösungen der Wirkstoffe unter kontrollierten Bedingungen verdampft wurden. Die entstandenen Beschichtungen erlauben die passive Beladung auch von kolloidalen Systemen, für die Filter mit einer höheren Ausschlussgrenze als 0,22 µm oder 0,45 µm verwendet werden müssen. Am Beispiel von KuRei300 wurde deutlich, dass die Beschichtungen physikochemisch charakterisiert werden müssen, weil der ursprünglich eingesetzte Wirkstoff in einer veränderten physikalischen Form anfallen kann.

Durch die entwickelten Abläufe bei der Handhabung von Wirkstoffen und Trägersystemen lässt sich die passive Beladung gut als Screening-Instrument oder Herstellungsmethode für den Labormaßstab einsetzen. Es besteht noch Potential für die weitere Miniaturisierung.

Für die Untersuchung der Wirkstofflokalisation in Dispersionen flüssiger und fester Lipidnanopartikel wurden gut definierte Systeme verschiedener Partikelgrößenklassen entwickelt. Die Partikel in Emulsionen und Suspensionen bestanden aus Trimyristin und waren mit Poloxamer 188 stabilisiert. Als schwer wasserlösliche Verbindungen wurden Amphotericin B, Curcumin, Dibucain, Fenofibrat, Mefenaminsäure, Propofol und 5,10,15,20-tetrakis(4-hydroxyphenyl)-21H,23H-porphin ausgewählt. In Abhängigkeit von der Substanz wurden Konzentrationen zwischen weniger als 1 % und mehr als 90% bezogen auf

Trimyristin erzielt. Schlussfolgerungen über die Wirkstofflokalisierung wurden aus dem Vergleich von Dispersionen mit gleicher Trimyristinmenge, aber unterschiedlichem physikalischen Zustand und unterschiedlicher Größe der Partikel gezogen. Der Verzicht auf sehr spezialisierte Analysemethoden erlaubte es, pharmazeutisch relevante Moleküle in praxisbezogenen Konzentrationen zu untersuchen. Eine zentrale Erkenntnis der Experimente ist, dass kleinere Partikel häufig zu einer höheren Beladung führen als größere. Bei Emulsionströpfchen wurde sowohl die Lipidmatrix als auch die Partikelgrenzfläche als Aufenthaltsort für Wirkstoffmoleküle identifiziert. Bei festen Lipidpartikeln halten sie sich offenbar vornehmlich in der Grenzfläche auf. Für Amphotericin B und Curcumin waren die Suspensionen den Emulsionen in ihrer Beladungskapazität überlegen. Bei Dibucain, Fenofibrat und Mefenaminsäure war es umgekehrt. Für Propofol kann diesbezüglich keine Aussage gemacht werden, weil es mit Trimyristin eine eutektische Mischung bildete, die den physikalischen Zustand der Partikel in der Suspension veränderte. Auch für das Porphyrinderivat ist eine Interpretation der Ergebnisse schwer möglich. In den beladenen Emulsionen trat ein ausgeprägtes Kristallwachstum auf, das auf eine veränderte physikalische Form der Ausgangssubstanz zurückgeführt wurde.

Als mögliche Mechanismen für die passive Beladung wurden sowohl die Diffusion des Wirkstoffs durch die wässrige Phase als auch der direkte physische Kontakt zwischen Wirkstoffbulk und Partikel diskutiert. Unabhängig vom exakten Hergang ist anzunehmen, dass die passive Beladung – ebenso wie die *De-novo*-Herstellung – dann erfolgreich ist, wenn der Wirkstoff eine ausreichende Affinität zur Matrix oder/und Grenzfläche der Lipidpartikel besitzt. Bei der passiven Beladung ist praxisrelevant, wie schnell die entsprechenden Vorgänge auf molekularer Ebene stattfinden. Untersuchungen zur Geschwindigkeit weisen darauf hin, dass der Beladungsvorgang innerhalb weniger Stunden beendet sein kann. Möglichkeiten, den Ablauf der passiven Beladung detaillierter zu untersuchen, wären der Einsatz unterschiedlich stark zerkleinerten Wirkstoffs, das Erzeugen einer Diffusionsbarriere um den Lipidpartikel oder der Vergleich von Wirkstoffen mit unterschiedlicher Löslichkeit in der wässrigen Phase bei gleichem Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten.

Für KuRei300 wurden mit Hilfe der passiven Beladung substanzsparend unterschiedliche lipidbasierte kolloidale Systeme gescreent: eine Emulsion, Liposomen, Dispersionen unterkühlt-smektischer und kubischer Partikel sowie Mischmizellen. Die höchsten Beladungen wurden mit den Mischmizellen und den Liposomen erhalten. Die Formulierungsarbeiten zeigten, dass KuRei300 unter Lichteinfluss isomerisiert, sich in Lösung zersetzt und verschiedene Modifikationen sowie den amorphen Zustand annehmen kann. Die Lecithin-Gallensalz-Mischmizellen wurden unter Zusatz von Ethylendiamintetraessigsäure und Stickstoffbegasung als parenterale Formulierung für die Tierstudien ausgewählt.

## 7 Referenzen

- [1] **C.A. Lipinski**, Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 44 (2000) 235–249.
- [2] **P. van Hoogevest, X. Liu, A. Fahr**, Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs: the industrial perspective, *Expert Opinion on Drug Delivery* 8 (2011) 1481–1500.
- [3] **S. Balbach, C. Korn**, Pharmaceutical evaluation of early development candidates "the 100 mg-approach", *International Journal of Pharmaceutics* 275 (2004) 1–12.
- [4] **Rote Liste Service GmbH**, Rote Liste 2013, Rote Liste Service GmbH, Frankfurt/ Main, 2013.
- [5] **H. Bunjes**, Lipid nanoparticles for the delivery of poorly water-soluble drugs, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62 (2010) 1637–1645.
- [6] **A. Lancelot, T. Sierra, J.L. Serrano**, Nanostructured liquid-crystalline particles for drug delivery, *Expert Opinion on Drug Delivery* 11 (2014) 547–564.
- [7] **H. Bunjes**, Lipidsysteme zur parenteralen Anwendung - Nanoemulsionen und Lipidnanopartikel, in: Mäder, K., Weidenauer, U. (Herausgeber), *Innovative Arzneiformen: Ein Lehrbuch für Studium und Praxis*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2010, Seiten 195 f.
- [8] **K. Hippalgaonkar, S. Majumdar, V. Kansara**, Injectable lipid emulsions - Advancements, opportunities and challenges, *AAPS PharmSciTech* 11 (2010) 1526–1540.
- [9] **K. Westesen, H. Bunjes, M. Koch**, Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential, *Journal of Controlled Release* 48 (1997) 223–236.
- [10] **K. Rosenblatt, H. Bunjes**, A screening approach to determine the solubilization capacity of lipid nanoparticles for poorly soluble drugs. Poster abstract # 126, 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (2008) [http://www.pharmtech.tu-bs.de/cms/files/poster/2008/Rosenblatt\\_Abtract\\_PBPWorldMeetingBarcelona\\_2008.pdf](http://www.pharmtech.tu-bs.de/cms/files/poster/2008/Rosenblatt_Abtract_PBPWorldMeetingBarcelona_2008.pdf), accessed December 2013.
- [11] **V. Jennings, S.H. Gohla**, Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN®), *Journal of Microencapsulation* 18 (2001) 149–158.

- [12] **V.J. Stella, K.W. Nti-Addae**, Prodrug strategies to overcome poor water solubility, *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) 677–694.
- [13] **S.L. Morissette, Ö. Almarsson, et al., C.R. Gardner**, High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids, *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2003) 275–300.
- [14] **H. Gelderblom, J. Verweij, K. Nooter, A. Sparreboom**, Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation, *European Journal of Cancer* 37 (2001) 1590–1598.
- [15] **S.V. Kurkov, T. Loftsson**, Cyclodextrins, *International Journal of Pharmaceutics* 453 (2013) 167–180.
- [16] **E. Merisko-Liversidge, G.G. Liversidge**, Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: a perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology, *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (2011) 427–440.
- [17] **S. van Janssens, G. van den Mooter**, Review: physical chemistry of solid dispersions, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61 (2009) 1571–1586.
- [18] **McNeil**, Dolormin® Extra Fachinformation (2014).
- [19] **Temmler Pharma**, Faustan® Injektionslösung Fachinformation (2006).
- [20] **MSD**, Ivemend® Fachinformation (2013).
- [21] **Abbott Arzneimittel**, Lipidil 145 One® Fachinformation (2013).
- [22] **Astellas Pharma GmbH**, Prograf® Fachinformation (2014).
- [23] **medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbh**, Taxomedac® Fachinformation (2012).
- [24] **Pfizer Pharma GmbH**, Vfend® Fachinformation (2014).
- [25] **K.H. Bauer, K.-H. Frömming, C. Führer**, Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie, Seite(n) 76 f., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2002.
- [26] **Y.E. Rahman, E.A. Cerny, K.R. Patel**, Differential uptake of liposomes varying in size and lipid composition by parenchyma and Kupffer cells of mouse liver, *Life Sciences* 31 (1982) 2061–2071.
- [27] **O. Ishida, K. Maruyama, K. Sasaki, M. Iwatsuru**, Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice, *International Journal of Pharmaceutics* 190 (1999) 49–56.

- 
- [28] **H. Maeda, J. Wu, et al., K. Hori**, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *Journal of Controlled Release* 65 (2000) 271–284.
- [29] **H. Maeda**, The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting, *Advances in Enzyme Regulation* 41 (2001) 189–207.
- [30] **A.L. Klibanov, K. Maruyama, V.P. Torchilin, L. Huang**, Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes, *FEBS Letters* 268 (1990) 235–237.
- [31] **A. Puri, K. Loomis, et al., R. Blumenthal**, Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 26 (2009) 523–580.
- [32] **S. Benita, D. Friedman, M. Weinstock**, Physostigmine emulsion: a new injectable controlled release delivery system, *International Journal of Pharmaceutics* 30 (1986) 47–55.
- [33] **R. Duncan, R. Gaspar**, Nanomedicine(s) under the microscope, *Molecular Pharmaceutics* 8 (2011) 2101–2141.
- [34] **N. Ahmed, C.E. Mora-Huertas, et al., A. Elaissari**, Polymeric drug delivery systems for encapsulating hydrophobic drugs, in: D. Douroumis, A. Fahr (Herausgeber), *Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs*, Wiley, Chichester, 2013.
- [35] **I. Sorrento Therapeutics**, <http://sorrentotherapeutics.com/sorrento-announces-first-patient-dosed-in-registration-trial-to-evaluate-bioequivalence-between-cynviloq-and-abraxane/>, Zugriff 31/10/2014.
- [36] **Y. Lu, K. Park**, Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs, *International Journal of Pharmaceutics* 453 (2013) 198–214.
- [37] **F. Kratz**, Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles, *Journal of Controlled Release* 132 (2008) 171–183.
- [38] **Celgene Europe Limited**, Abraxane® Fachinformation (2014).
- [39] **N.K. Jain, R.K. Tekade**, Dendrimers for enhanced drug solubilization, in: D. Douroumis, A. Fahr (Herausgeber), *Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs*, Wiley, Chichester, 2013.
- [40] **S. Svenson**, Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71 (2009) 445–462.

- [41] **R. Duncan**, Polymer therapeutics: top 10 selling pharmaceuticals - What next?, *Journal of Controlled Release* 190 (2014) 371–380.
- [42] **Starpharma**, <http://www.starpharma.com/vivagel>, Zugriff 04/11/2014.
- [43] **S.S. Davis, C. Washington, et al., R. Kirsh**, Lipid emulsions as drug delivery systems, *Annals of the New York Academy of Sciences* 507 (1987) 75–88.
- [44] **B. Siekmann, K. Westesen**, Submicron-sized parenteral carrier systems based on solid lipids, *Pharmaceutical and Pharmacological Letters* (1992) 123–126.
- [45] **J. Kuntsche, K. Westesen, et al., H. Bunjes**, Supercooled smectic nanoparticles: a potential novel carrier system for poorly water soluble drugs, *Pharmaceutical Research* 21 (2004) 1834–1843.
- [46] **R.H. Müller, M. Radtke, S.A. Wissing**, Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs, *International Journal of Pharmaceutics* 242 (2002) 121–128.
- [47] **J. Kuntsche, J.C. Horst, H. Bunjes**, Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems, *International Journal of Pharmaceutics* 417 (2011) 120–137.
- [48] **P. van Hoogevest, X. Liu, A. Fahr, M. Leigh**, Role of phospholipids in the oral and parenteral delivery of poorly water soluble drugs, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 21 (2011) 5–16.
- [49] **X. Mulet, B.J. Boyd, C.J. Drummond**, Advances in drug delivery and medical imaging using colloidal lyotropic liquid crystalline dispersions, *Journal of Colloid and Interface Science* 393 (2013) 1–20.
- [50] **K. Jores, W. Mehnert, et al., K. Mäder**, Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy, *Journal of Controlled Release* 95 (2004) 217–227.
- [51] **K. Jores, A. Haberland, et al., W. Mehnert**, Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and oil-loaded SLN studied by spectrofluorometry and raman spectroscopy, *Pharmaceutical Research* 22 (2005) 1887–1897.
- [52] **R.H. Müller, R. Shegokar, C.M. Keck**, 20 years of lipid nanoparticles (SLN & NLC): present state of development & industrial applications, *Current Drug Discovery Technologies* 8 (2011) 207–227.



- [53] **X.Q. Wang, Q. Zhang**, Microemulsions for drug solubilization and delivery, in: D. Douroumis, A. Fahr (Herausgeber), Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs, Wiley, Chichester, **2013**.
- [54] **D.G. Fatouros, A. Müllertz**, Development of self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for oral bioavailability enhancement of poorly soluble drugs, in: D. Douroumis, A. Fahr (Herausgeber), Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs, Wiley, Chichester, **2013**.
- [55] **X.Q. Wang, Q. Zhang**, Microemulsions for drug solubilization and delivery, in: D. Douroumis, A. Fahr (Herausgeber), Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs, Wiley, Chichester, **2013**.
- [56] **FDA**, Neoral<sup>®</sup>, <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/>, Zugriff **08/11/2014**.
- [57] **A. Wretling**, Development of fat emulsions, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition 5 (**1981**) 230–235.
- [58] **C.C. Berton-Carabin, J.N. Coupland, R.J. Elias**, Effect of the lipophilicity of model ingredients on their location and reactivity in emulsions and solid lipid nanoparticles, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 431 (**2013**) 9–17.
- [59] **P. Kan, Z.-B. Chen, C.-J. Lee, I.-M. Chu**, Development of nonionic surfactant/phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system, Journal of Controlled Release 58 (**1999**) 271–278.
- [60] **K. Westesen, H. Bunjes**, Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix?, International Journal of Pharmaceutics 115 (**1995**) 129–131.
- [61] **S. Joseph, H. Bunjes**, Preparation of nanoemulsions and solid lipid nanoparticles by premix membrane emulsification, Journal of Pharmaceutical Sciences 101 (**2012**) 2479–2489.
- [62] **J.H. Finke, C. Richter, et al., C.C. Müller-Goymann**, Coumarin 6 as a fluorescent model drug: how to identify properties of lipid colloidal drug delivery systems via fluorescence spectroscopy?, European Journal of Lipid Science and Technology 116 (**2014**) 1234–1246.
- [63] **B. Strasdat, H. Bunjes**, Incorporation of lipid nanoparticles into calcium alginate beads and characterization of the encapsulated particles by differential scanning calorimetry, Food Hydrocolloids 30 (**2013**) 567–575.

- [64] **O. von Dardel, C. Mebius, T. Mossberg, B. Svensson**, Fat emulsion as a vehicle for diazepam. A study of 9492 patients, *British Journal of Anaesthesia* 55 (**1983**) 41–47.
- [65] **M.W. Lovell, H.W. Johnson, et al., C.C. Hsu**, Less-painful emulsion formulations for intravenous administration of clarithromycin, *International Journal of Pharmaceutics* 109 (**1994**) 45–57.
- [66] **A. Tibell, M. Larsson, A. Alvestrand**, Dissolving intravenous cyclosporin A in a fat emulsion carrier prevents acute renal side effects in the rat, *Transplant International* 6 (**1993**) 69–72.
- [67] **D. Forster, C. Washington, S.S. Davis**, Toxicity of solubilized and colloidal amphotericin B formulations to human erythrocytes, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 40 (**1988**) 325–328.
- [68] **A.J. Repta**, Formulation of investigational anticancer drugs, in: D. Breimer, P. Speiser (Herausgeber), *Topics in Pharmaceutical Sciences*, Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, **1981**.
- [69] **D. Goldstein, O. Gofrit, A. Nyska, S. Benita**, Anti-HER2 cationic immunoemulsion as a potential targeted drug delivery system for the treatment of prostate cancer, *Cancer Research* 67 (**2007**) 269–275.
- [70] **B. Magenheimer, M.Y. Levy, S. Benita**, A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers - Ultrafiltration technique at low pressure, *International Journal of Pharmaceutics* 94 (**1993**) 115–123.
- [71] **C. Washington, K. Evans**, Release rate measurements of model hydrophobic solutes from submicron triglyceride emulsions, *Journal of Controlled Release* 33 (**1995**) 383–390.
- [72] **L. Salmela, C. Washington**, A continuous flow method for estimation of drug release rates from emulsion formulations, *International Journal of Pharmaceutics* 472 (**2014**) 276–281.
- [73] **J.B. Cannon, Y. Shi, P. Gupta**, Emulsions, microemulsions and lipid-based drug delivery systems for drug solubilization and drug delivery - Part I: Parenteral applications, in: R. Liu (Herausgeber), *Water-insoluble drug formulation*, 2. Ausgabe, CRC Press, Boca Raton, **2008**, Seiten 195–226.
- [74] **P.P. Constantinides, A. Tustian, D.R. Kessler**, Tocol emulsions for drug solubilization and parenteral delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (**2004**) 1243–1255.

- 
- [75] **H. Bunjes, K. Westesen, M. Koch**, Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics* 129 (1996) 159–173.
- [76] **H. Bunjes, B. Siekmann, K. Westesen**, Emulsions of supercooled melts - A novel drug delivery system, in: S. Benita (Herausgeber), *Submicron emulsions in drug targeting and delivery*, Harwood Academic Publ., Amsterdam, **1998**, Seiten 175 ff.
- [77] **S. Joseph, H. Bunjes**, Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery, in: D. Douroumis, A. Fahr (Herausgeber), *Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs*, Wiley, Chichester, **2013**, Seiten 103 ff.
- [78] **R.H. Müller, W. Mehnert, et al., D. Ruhl**, Solid lipid nanoparticles (SLN) - An alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 41 (1995) 62–69.
- [79] **B. Siekmann, K. Westesen**, Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 42 (1996) 104–109.
- [80] **K.M. Rosenblatt, H. Bunjes**, Poly(vinyl alcohol) as emulsifier stabilizes solid triglyceride drug carrier nanoparticles in the  $\alpha$ -modification, *Molecular Pharmaceutics* 6 (2009) 105–120.
- [81] **H. Bunjes, M. Koch, K. Westesen**, Effect of particle size on colloidal solid triglycerides, *Langmuir* 16 (2000) 5234–5241.
- [82] **H. Bunjes, M. Drechsler, M. Koch, K. Westesen**, Incorporation of the model drug ubidecarenone into solid lipid nanoparticles, *Pharmaceutical Research* 18 (2001) 287–293.
- [83] **W. Mehnert, K. Mäder**, Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications, *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012) 83–101.
- [84] **H. Bunjes, F. Steiniger, W. Richter**, Visualizing the structure of triglyceride nanoparticles in different crystal modifications, *Langmuir* 23 (2007) 4005–4011.
- [85] **S. Petersen, F. Steiniger, et al., H. Bunjes**, The physical state of lipid nanoparticles influences their effect on in vitro cell viability, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 79 (2011) 150–161.
- [86] **A. zur Mühlen, C. Schwarz, W. Mehnert**, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - Drug release and release mechanism, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45 (1998) 149–155.

- [87] **P. van Hoogevest, M. Leigh, A. Fahr**, Liposomes as intravenous solubilizers for poorly water-soluble drugs, in: D. Douroumis, A. Fahr (Herausgeber), Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs, Wiley, Chichester, **2013**.
- [88] **T.M. Allen, P.R. Cullis**, Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews* 65 (**2013**) 36–48.
- [89] **T.M. Allen, A. Chonn**, Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system, *FEBS Letters* 223 (**1987**) 42–46.
- [90] **T.M. Allen, C. Hansen, J. Rutledge**, Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 981 (**1989**) 27–35.
- [91] **A. Sharma, U.S. Sharma**, Liposomes in drug delivery: progress and limitations, *International Journal of Pharmaceutics* 154 (**1997**) 123–140.
- [92] **A. Gabizon, R. Catane, et al., Y. Barenholz**, Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes, *Cancer Research* 54 (**1994**) 987–992.
- [93] **J. Lasch, V. Weissig, M. Brandl**, Preparation of liposomes, in: V.P. Torchilin, V. Weissig (Herausgeber), *Liposomes: A practical approach*, Oxford University Press, New York, **2003**, Seiten 3–29.
- [94] **C. Chen, D. Han, C. Cai, X. Tang**, An overview of liposome lyophilization and its future potential, *Journal of Controlled Release* 142 (**2010**) 299–311.
- [95] **I.M. Hann, H. Grant Prentice**, Lipid-based amphotericin B: a review of the last 10 years of use, *International Journal of Antimicrobial Agents* 17 (**2001**) 161–169.
- [96] **G. Batist, G. Ramakrishnan, et al., L.W. Lee**, Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer, *Journal of Clinical Oncology* 19 (**2001**) 1444–1454.
- [97] **C.E. Petre, D.P. Dittmer**, Liposomal daunorubicin as treatment for Kaposi's sarcoma, *International Journal of Nanomedicine* 2 (**2007**) 277–288.
- [98] **C. Porter, N.L. Trevaskis, W.N. Charman**, Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs, *Nature Reviews Drug Discovery* 6 (**2007**) 231–248.
- [99] **Rote Liste Service GmbH**, Rote Liste 2013, Seite(n) 293, Rote Liste Service GmbH, Frankfurt/ Main, **2013**.

- [100] **J.R. Soedirman, E.A. de Bruijn, et al., J. Grüter**, Pharmacokinetics and tolerance of intravenous and intramuscular phyloquinone (vitamin K1) mixed micelles formulation, *British Journal of Clinical Pharmacology* 41 (**1996**) 517–523.
- [101] **D.D. Lasic**, Mixed micelles in drug delivery, *Nature* 355 (**1992**) 279–280.
- [102] **G.S. Ginsburg, D. Atkinson, D.M. Small**, Physical properties of cholesteryl esters, *Progress in Lipid Research* 23 (**1984**) 135–167.
- [103] **J. Kuntsche**, Unterkühlt-Smektische Lipid-Nanopartikel: Entwicklung und Charakterisierung eines neuartigen Trägersystems für schwer wasserlösliche Arzneistoffe, Friedrich-Schiller-Universität Jena, **2006**.
- [104] **J. Kuntsche, H. Bunjes**, Influence of preparation conditions and heat treatment on the properties of supercooled smectic cholesteryl myristate nanoparticles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 67 (**2007**) 612–620.
- [105] **J. Kuntsche, M. Koch, A. Fahr, H. Bunjes**, Supercooled smectic nanoparticles: influence of the matrix composition and in vitro cytotoxicity, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 38 (**2009**) 238–248.
- [106] **F. Mengersen, H. Bunjes**, Chemical stability of phospholipid-stabilized supercooled smectic cholesteryl myristate nanoparticles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 82 (**2012**) 262–271.
- [107] **J. Kuntsche, M. Koch, M. Drechsler, H. Bunjes**, Crystallization behavior of supercooled smectic cholesteryl myristate nanoparticles containing phospholipids as stabilizers, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 44 (**2005**) 25–35.
- [108] **T. Hevonoja, M.O. Pentikäinen, et al., M. Ala-Korpela**, Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1488 (**2000**) 189–210.
- [109] **F. Mengersen, H. Bunjes**, PEGylation of supercooled smectic cholesteryl myristate nanoparticles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 81 (**2012**) 409–417.
- [110] **S. Phan, W.-K. Fong, et al., B.J. Boyd**, Evaluating the link between self-assembled mesophase structure and drug release, *International Journal of Pharmaceutics* 421 (**2011**) 176–182.
- [111] **C. Guo, J. Wang, et al., G. Zhai**, Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery, *Drug Discovery Today* 15 (**2010**) 1032–1040.

- [112] **G. Wörle, B. Siekmann, M. Koch, H. Bunjes**, Transformation of vesicular into cubic nanoparticles by autoclaving of aqueous monoolein/poloxamer dispersions, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 27 (2006) 44–53.
- [113] **P.T. Spicer, K.L. Hayden, et al., J.L. Burns**, Novel process for producing cubic liquid crystalline nanoparticles (cubosomes), *Langmuir* 17 (2001) 5748–5756.
- [114] **P.T. Spicer, W.B. Small, M.L. Lynch, J.L. Burns**, Dry powder precursors of cubic liquid crystalline nanoparticles (cubosomes), *Journal of Nanoparticle Research* 4 (2002) 297–311.
- [115] **J. Lai, J. Chen, et al., W. Wu**, Glyceryl monooleate/poloxamer 407 cubic nanoparticles as oral drug delivery systems: I. in vitro evaluation and enhanced oral bioavailability of the poorly water-soluble drug simvastatin, *AAPS PharmSciTech* 10 (2009) 960–966.
- [116] **T.-H. Nguyen, T. Hanley, C. Porter, B.J. Boyd**, Nanostructured liquid crystalline particles provide long duration sustained-release effect for a poorly water soluble drug after oral administration, *Journal of Controlled Release* 153 (2011) 180–186.
- [117] **E. Esposito, R. Cortesi, et al., C. Puglia**, Cubosome dispersions as delivery systems for percutaneous administration of indomethacin, *Pharmaceutical Research* 22 (2005) 2163–2173.
- [118] **M. Johnsson, J. Barauskas, A. Norlin, F. Tiberg**, Physicochemical and drug delivery aspects of lipid-based liquid crystalline nanoparticles: a case study of intravenously administered propofol, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 6 (2006) 3017–3024.
- [119] **Y. Chen, Y. Lu, et al., S. Gao**, Ocular delivery of cyclosporine A based on glyceryl monooleate/poloxamer 407 liquid crystalline nanoparticles: preparation, characterization, in vitro corneal penetration and ocular irritation, *Journal of Drug Targeting* 20 (2012) 856–863.
- [120] **L. Gan, S. Han, et al., Y. Gan**, Self-assembled liquid crystalline nanoparticles as a novel ophthalmic delivery system for dexamethasone: improving preocular retention and ocular bioavailability, *International Journal of Pharmaceutics* 396 (2010) 179–187.
- [121] **S. Han, J.-Q. Shen, et al., L. Gan**, Novel vehicle based on cubosomes for ophthalmic delivery of flurbiprofen with low irritancy and high bioavailability, *Acta Pharmacologica Sinica* 31 (2010) 990–998.
- [122] **C. Nilsson, J. Østergaard, et al., A. Yaghmur**, PEGylation of phytantriol-based lyotropic liquid crystalline particles - The effect of lipid composition, PEG chain length, and temperature on the internal nanostructure, *Langmuir* 30 (2014) 6398–6407.

- [123] **B. Angelov, A. Angelova, et al., S. Lesieur**, Protein-containing PEGylated cubosomic particles: freeze-fracture electron microscopy and synchrotron radiation circular dichroism study, *Journal of Physical Chemistry B* 116 (2012) 7676–7686.
- [124] **K.M. Rosenblatt, D. Douroumis, H. Bunjes**, Drug release from differently structured monoolein/poloxamer nanodispersions studied with differential pulse polarography and ultrafiltration at low pressure, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96 (2007) 1564–1575.
- [125] **G. Wörle, B. Siekmann, H. Bunjes**, Effect of drug loading on the transformation of vesicular into cubic nanoparticles during heat treatment of aqueous monoolein/poloxamer dispersions, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 63 (2006) 128–133.
- [126] **J.C. Bode, J. Kuntsche, S.S. Funari, H. Bunjes**, Interaction of dispersed cubic phases with blood components, *International Journal of Pharmaceutics* 448 (2013) 87–95.
- [127] **R.J. Pranker, S.G. Frank, V.J. Stella**, Preliminary development and evaluation of a parental emulsion formulation of penclomedine (NSC-338720; 3,5-dichloro-2,4-dimethoxy-6-trichloromethylpyridine): a novel, practically water insoluble cytotoxic agent, *Journal of Parenteral Science and Technology* 42 (1988) 76–81.
- [128] **M.Y. Levy, S. Benita**, Design and characterization of a submicronized o/w emulsion of diazepam for parenteral use, *International Journal of Pharmaceutics* 54 (1989) 103–112.
- [129] **N.S. Santos Magalhaes, G. Cave, M. Seiller, S. Benita**, The stability and in vitro release kinetics of a clofibrate emulsion, *International Journal of Pharmaceutics* 76 (1991) 225–237.
- [130] **K. Hippalgaonkar, G.R. Adelli, M.A. Repka, S. Majumdar**, Indomethacin-loaded solid lipid nanoparticles for ocular delivery: development, characterization, and in vitro evaluation, *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 29 (2013) 216–228.
- [131] **S. Martins, I. Tho, et al., M. Brandl**, Brain delivery of camptothecin by means of solid lipid nanoparticles: formulation design, in vitro and in vivo studies, *International Journal of Pharmaceutics* 439 (2012) 49–62.
- [132] **A. Noack, G. Hause, K. Mäder**, Physicochemical characterization of curcuminoid-loaded solid lipid nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics* 423 (2012) 440–451.

- [133] **P. Basnet, H. Hussain, I. Tho, N. Skalko-Basnet**, Liposomal delivery system enhances anti-inflammatory properties of curcumin, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101 (2012) 598–609.
- [134] **A. Sharma, E. Mayhew, R.M. Straubinger**, Antitumor effect of taxol-containing liposomes in a taxol-resistant murine tumor model, *Cancer Research* 53 (1993) 5877–5881.
- [135] **A. Deniz, A. Sade, et al., S. Banerjee**, Celecoxib-loaded liposomes: effect of cholesterol on encapsulation and in vitro release characteristics, *Bioscience Reports* 30 (2010) 365–373.
- [136] **R.R. New, M.L. Chance, S. Heath**, Antileishmanial activity of amphotericin and other antifungal agents entrapped in liposomes, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 8 (1981) 371–381.
- [137] **R.J. Prankerd, V.J. Stella**, The use of oil-in-water emulsions as a vehicle for parenteral drug administration, *Journal of Parenteral Science and Technology* 44 (1990) 139–149.
- [138] **C.L. Fortner, W.R. Grove, D. Bowie, M.D. Walker**, Fat emulsion vehicle for intravenous administration of an aqueous insoluble drug, *American Journal of Hospital Pharmacy* 32 (1975) 582–584.
- [139] **A.-A. El-Sayed, A.J. Repta**, Solubilization and stabilization of an investigational antineoplastic drug (NSC no. 278214) in an intravenous formulation using an emulsion vehicle, *International Journal of Pharmaceutics* 13 (1983) 303–312.
- [140] **R.G. Strickley, B.D. Anderson**, Solubilization and stabilization of an anti-HIV thiocarbamate, NSC 629243, for parenteral delivery, using extemporaneous emulsions, *Pharmaceutical Research* 10 (1993) 1076–1082.
- [141] **M. Paborji, C.M. Riley, V.J. Stella**, A novel use of Intralipid for the parenteral delivery of perilla ketone (NSC-348407), an investigational cytotoxic drug with a high affinity for plastic, *International Journal of Pharmaceutics* 42 (1988) 243–249.
- [142] **W. Sila-On, N. Vardhanabhuti, B. Ongpipattanakul, P. Kulvanich**, Influence of incorporation methods on partitioning behavior of lipophilic drugs into various phases of a parenteral lipid emulsion, *AAPS PharmSciTech* 9 (2008) 684–692.
- [143] **R.H. Müller, S. Schmidt, et al., S. Brömer**, SolEmuls® - Novel technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs, *International Journal of Pharmaceutics* 269 (2004) 293–302.



- 
- [144] **A. Akkar, P. Namsolleck, M. Blaut, R. Müller**, Solubilizing poorly soluble antimycotic agents by emulsification via a solvent-free process, *AAPS PharmSciTech* 5 (2004).
- [145] **P. Ahlin, J. Kristl, et al., S. Pečar**, Influence of spin probe structure on its distribution in SLN dispersions, *International Journal of Pharmaceutics* 196 (2000) 241–244.
- [146] **C. Braem, T. Blaschke, et al., K. Kramer**, Interaction of drug molecules with carrier systems as studied by preelectric spectroscopy and electron spin resonance, *Journal of Controlled Release* 119 (2007) 128–135.
- [147] **U. Yucel, R.J. Elias, J.N. Coupland**, Solute distribution and stability in emulsion-based delivery systems: an EPR study, *Journal of Colloid and Interface Science* 377 (2012) 105–113.
- [148] **S. Lombardi Borgia, M. Regehy, et al., M. Schäfer-Korting**, Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement - Correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and preelectric spectroscopy, *Journal of Controlled Release* 110 (2005) 151–163.
- [149] **R. Sivaramakrishnan, C. Nakamura, et al., M. Schäfer-Korting**, Glucocorticoid entrapment into lipid carriers - Characterisation by preelectric spectroscopy and influence on dermal uptake, *Journal of Controlled Release* 97 (2004) 493–502.
- [150] **K. Jores, W. Mehnert, K. Mäder**, Physicochemical investigations on solid lipid nanoparticles and on oil-loaded solid lipid nanoparticles: a nuclear magnetic resonance and electron spin resonance study, *Pharmaceutical Research* 20 (2003) 1274–1283.
- [151] **J. Alsenz, M. Kansy**, High throughput solubility measurement in drug discovery and development, *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) 546–567.
- [152] **W.-G. Dai, C. Pollock-Dove, L.C. Dong, S. Li**, Advanced screening assays to rapidly identify solubility-enhancing formulations: high-throughput, miniaturization and automation, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008) 657–672.
- [153] **H. Chen, Z. Zhang, et al., K. Heimlich**, A high-throughput combinatorial approach for the discovery of a Cremophor EL-free paclitaxel formulation, *Pharmaceutical Research* 20 (2003) 1302–1308.
- [154] **W.-G. Dai, L.C. Dong, et al., G. Eichenbaum**, Parallel screening approach to identify solubility-enhancing formulations for improved bioavailability of a poorly water-soluble compound using milligram quantities of material, *International Journal of Pharmaceutics* 336 (2007) 1–11.

- [155] **J. Alsensz, E. Meister, E. Haenel**, Development of a partially automated solubility screening (PASS) assay for early drug development, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96 (2007) 1748–1762.
- [156] **M. Sznitowska, E.A. Dabrowska, S. Janicki**, Solubilizing potential of submicron emulsions and aqueous dispersions of lecithin, *International Journal of Pharmaceutics* 246 (2002) 203–206.
- [157] **P. van Hoogevest, V. Rogue, et al., M. Leigh**, Instant solubilization of poorly water-soluble drugs by in-situ loading of aqueous phospholipid dispersions suitable for parenteral administration, *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 60 (2006) 366–377.
- [158] **F. Chappuis, S. Sundar, et al., M. Boelaert**, Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?, *Nature Reviews Microbiology* 5 (2007) 873–882.
- [159] **World Health Organization**,  
[www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html), Zugriff 20/08/2012.
- [160] **J. Ryczak, C. Kunick**, Antimon und mehr: Wirkstoffe zur Behandlung von Leishmaniosen, *Pharmazie in Unserer Zeit* 38 (2009) 538–544.
- [161] **C. Reichwald, O. Shimony, et al., C. Kunick**, 2-(3-Aryl-3-oxopropen-1-yl)-9-tert-butyl-paullones: a new antileishmanial chemotype, *Journal of Medicinal Chemistry* 51 (2008) 659–665.
- [162] **C.L. Jaffe**, Schriftlicher Projektbericht im Rahmen des Projekts „Protein kinases – Novel drug targets of post genomic era“, Projektnummer LSHB-CT-2004-503467, Deliverable 190.
- [163] **Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn**, Europäisches Arzneibuch, Grundwerk, Monographien, Eschborn, 2011.
- [164] **P.P. Constantinides, K.J. Lambert, et al., S.C. Quay**, Formulation development and antitumor activity of a filter-sterilizable emulsion of paclitaxel, *Pharmaceutical Research* 17 (2000) 175–182.
- [165] **W.J. Gibbs, T.M. Hagemann**, Purified poloxamer 188 for sickle cell vaso-occlusive crisis, *Annals of Pharmacotherapy* 38 (2004) 320–324.
- [166] **Rote Liste Service GmbH**, Rote Liste 2013, Seite(n) 893, Rote Liste Service GmbH, Frankfurt/ Main, 2013.

- [167] **T. Loftsson, M.E. Brewster**, Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62 (2010) 1607–1621.
- [168] **Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn**, Kommentar zur Pharmacopoea Europaea, 4, Eschborn, 2009.
- [169] **A.J. Hopfinger, E.X. Esposito, et al., J.M. Goodman**, Findings of the challenge to predict aqueous solubility, *Journal of Chemical Information and Modeling* 49 (2009) 1–5.
- [170] **Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn**, Europäisches Arzneibuch, Grundwerk, 4, Eschborn, 2011.
- [171] **A. Llinàs, R.C. Glen, J.M. Goodman**, Solubility challenge: can you predict solubilities of 32 molecules using a database of 100 reliable measurements?, *Journal of Chemical Information and Modeling* 48 (2008) 1289–1303.
- [172] **A.B. Kunnumakkara, P. Anand, B.B. Aggarwal**, Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins, *Cancer Letters* 269 (2008) 199–225.
- [173] **Documed AG**, Arzneimittel-Kompendium der Schweiz, [www.kompendium.ch](http://www.kompendium.ch), Zugriff 25/11/2013.
- [174] **K. Westesen**, Beitrag zur Strukturaufklärung eines arzneistoffhaltigen hochkonzentrierten Tensidsystems und ausgewählter Verdünnungen. Dissertation, Braunschweig, 1988.
- [175] **Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände** (Herausgeber), Deutscher Arzneimittel-Codex: Allgemeine Hinweise: Konservierte wässrige Augentropfen, Govi-Verlag, Deutscher Apotheker-Verlag, Eschborn.
- [176] **A. Healy, B.F. McDonald, L. Tajber, O.I. Corrigan**, Characterisation of excipient-free nanoporous microparticles (NPMPs) of bendroflumethiazide, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69 (2008) 1182–1186.
- [177] **O.I. Corrigan**, Thermal analysis of spray dried products, *Thermochimica Acta* 248 (1995) 245–258.
- [178] **S.H. Yalkowsky, J.F. Krzyzaniak, G.H. Ward**, Formulation-related problems associated with intravenous drug delivery, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 87 (1998) 787–796.

- [179] **A.K. Shah, S.A. Agnihotri**, Recent advances and novel strategies in pre-clinical formulation development: an overview, *Journal of Controlled Release* 156 (**2011**) 281–296.
- [180] **S. Kohfeld**, Untersuchungen zur Synthese, biologischen Aktivität und Stabilität von Paullonen und verwandten d-annellierten [1]Benzazepinen. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, **2006**.
- [181] **C.J. Reichwald**, Eine neue Variante der Heck-Reaktion zur Darstellung antileishmanieller Paullone. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, **2008**.
- [182] **U. Weber, H. Thiele**, *NMR Spectroscopy: modern Spectral Analysis*, Seite(n) 169 ff., Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- [183] **A. Kanstrup, O. Buchardt**, Photochemical cis-trans isomerization of furylacryloylpeptides and their different kinetic behavior as substrates for carboxypeptidase Y, *Analytical Biochemistry* 194 (**1991**) 41–44.
- [184] **S. Iwata, T. Nishino, et al., S. Shibata**, Antitumorigenic activities of chalcones (II). Photo-isomerization of chalcones and the correlation with their biological activities, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 20 (**1997**) 1266–1270.
- [185] **J.T. Da Rocha, A. Sperança, C.W. Nogueira, G. Zeni**, Hypolipidaemic activity of orally administered diphenyl diselenide in Triton WR-1339-induced hyperlipidaemia in mice, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61 (**2009**) 1673–1679.
- [186] **P. Alexandridis, J.F. Holzwarth, T.A. Hatton**, Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association, *Macromolecules* 27 (**1994**) 2414–2425.
- [187] **K.J. Box, J.E.A. Comer**, Using measured pKa, LogP and solubility to investigate supersaturation and predict BCS class, *Current Drug Metabolism* 9 (**2008**) 869–878.
- [188] **K.A. Chu, S.H. Yalkowsky**, Predicting aqueous solubility: the role of crystallinity, *Current Drug Metabolism* 10 (**2009**) 1184–1191.
- [189] **Y. Yamaoka, R.D. Roberts, V.J. Stella**, Low-melting phenytoin prodrugs as alternative oral delivery modes for phenytoin: a model for other high-melting sparingly water-soluble drugs, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 72 (**1983**) 400–405.
- [190] **V. Martena, R. Censi, et al., P. Di Martino**, A new nanospray drying method for the preparation of nicergoline pure nanoparticles, *Journal of Nanoparticle Research* 14 (**2012**) Artikelnummer 934.
- [191] **H. Kala, U. Haack, P. Pollandt, G. Brezesinski**, Zur Polymorphie des Carbamazepins, *Acta Pharmaceutica Technologica* 32 (**1986**) 72–77.

- [192] **F.U. Krahn, J.B. Mielck**, Relations between several polymorphic forms and the dihydrate of carbamazepine, *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 62 (**1987**) 247–254.
- [193] **D.E. Alonzo, G. Zhang, et al., L.S. Taylor**, Understanding the behaviour of amorphous pharmaceutical systems during dissolution, *Pharmaceutical Research* 27 (**2010**) 608–618.
- [194] **S.B. Murdande, M.J. Pikal, R.M. Shanker, R.H. Bogner**, Solubility advantage of amorphous pharmaceuticals, part 3: is maximum solubility advantage experimentally attainable and sustainable?, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 100 (**2011**).
- [195] **J. Bauer, S. Spanton, et al., J. Morris**, Ritonavir: an extraordinary example of conformational polymorphism, *Pharmaceutical Research* 18 (**2001**) 859–866.
- [196] **B.C. Hancock, M. Parks**, What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals?, *Pharmaceutical Research* 17 (**2000**) 397–404.
- [197] **B.C. Hancock, G. Zografi**, Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86 (**1997**) X1-12.
- [198] **R. Petrausch**, Lila Liste, Delta Verlag, Berlin, **1996**.
- [199] **E. Briones, C.I. Colino, J.M. Lanao**, Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells, *Journal of Controlled Release* 125 (**2008**) 210–227.
- [200] **J.J. Torrado, R. Espada, M.P. Ballesteros, S. Torrado-Santiago**, Amphotericin B formulations and drug targeting, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97 (**2008**) 2405–2425.
- [201] **J.D. Dunitz, J. Bernstein**, Disappearing Polymorphs, *Accounts of Chemical Research* 28 (**1995**) 193–200.
- [202] **Y. Zhou, R. Doyen, L.M. Lichtenberger**, The role of membrane cholesterol in determining bile acid cytotoxicity and cytoprotection of ursodeoxycholic acid, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1788 (**2009**) 507–513.
- [203] **S. Akare, J.D. Martinez**, Bile acid induces hydrophobicity-dependent membrane alterations, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1735 (**2005**) 59–67.
- [204] **G. Salvioli, E. Gaetti, et al., J.M. Pradelli**, Different resistance of mammalian red blood cells to hemolysis by bile salts, *Lipids* 28 (**1993**) 999–1003.
- [205] **S. Petersen, A. Fahr, H. Bunjes**, Flow cytometry as a new approach to investigate drug transfer between lipid particles, *Molecular Pharmaceutics* 7 (**2010**) 350–363.

- [206] **T. Unruh, H. Bunjes, K. Westesen, M. Koch**, Observation of size-dependent melting in lipid nanoparticles, *Journal of Physical Chemistry B* 103 (**1999**) 10373–10377.
- [207] **R.H. Müller, R. Schuhmann**, Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis, Seite(n) 25, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1996**.
- [208] **V. Klang, N.B. Matsko, C. Valenta, F. Hofer**, Electron microscopy of nanoemulsions: an essential tool for characterisation and stability assessment, *Micron* 43 (**2012**) 85–103.
- [209] **E. Kupetz, L. Preu, C. Kunick, H. Bunjes**, Parenteral formulation of an antileishmanial drug candidate – Tackling poor solubility, chemical instability, and polymorphism, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 85 (3 Part A) (**2013**) 511–520.
- [210] **A. Burger, R. Ramberger**, Thermodynamische Beziehungen zwischen polymorphen Modifikationen: Flufenaminsäure und Mefenaminsäure, *Mikrochimica Acta* 73 (**1980**) 17–28.
- [211] **A. Lemke, A.F. Kiderlen, O. Kayser**, Amphotericin B, *Applied Microbiology and Biotechnology* 68 (**2005**) 151–162.
- [212] **J. Mazerski, J. Grzybowska, E. Borowski**, Influence of net charge on the aggregation and solubility behaviour of amphotericin B and its derivatives in aqueous media, *European Biophysics Journal* 18 (**1990**) 159–164.
- [213] **B. Sarkar, V. Venugopal, M. Tsianou, P. Alexandridis**, Adsorption of Pluronic block copolymers on silica nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 422 (**2013**) 155–164.
- [214] **B. Foster, T. Cosgrove, B. Hammouda**, Pluronic triblock copolymer systems and their interactions with ibuprofen, *Langmuir* 26 (**2009**) 6760–6766.
- [215] **C. Dwyer, C. Viebke, J. Meadows**, Propofol induced micelle formation in aqueous block copolymer solutions, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 254 (**2005**) 23–30.
- [216] **M. Scherlund, A. Brodin, M. Malmsten**, Micellization and gelation in block copolymer systems containing local anesthetics, *International Journal of Pharmaceutics* 211 (**2000**) 37–49.
- [217] **U. Treiber**, Applicability of differential scanning calorimetry for the determination of drug concentration in lipid nanoparticles. Diploma Thesis, **2014**.
- [218] **Datenbank Scifinder** (Herausgeber), Werte berechnet mit: Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2013 ACD/Labs).

- [219] **D. Caillot, O. Casasnovas, et al., H. Guy**, Efficacy and tolerance of an amphotericin B lipid (Intralipid) emulsion in the treatment of candidaemia in neutropenic patients, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 31 (**1993**) 161–169.
- [220] **A. Ayestarán, R.M. López, et al., B. Pascual**, Pharmacokinetics of conventional formulation versus fat emulsion formulation of amphotericin B in a group of patients with neutropenia, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40 (**1996**) 609–612.
- [221] **Y. Shadkan, E. Segal, et al., D. Lichtenberg**, The use of commercially available lipid emulsions for the preparation of amphotericin B-lipid admixtures, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 39 (**1997**) 655–658.
- [222] **A. Glomme, J. März, J.B. Dressman**, Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94 (**2005**) 1–16.
- [223] **W.-G. Dai, L.C. Dong, et al., G. Eichenbaum**, Parallel screening approach to identify solubility-enhancing formulations for improved bioavailability of a poorly water-soluble compound using milligram quantities of material, *International Journal of Pharmaceutics* 336 (**2007**) 1–11.
- [224] **J. Ghasemi, S. Saaidpour**, QSRR prediction of the chromatographic retention behavior of painkiller drugs, *Journal of Chromatographic Science* 47 (**2009**) 156–163.
- [225] **O. Naksuryia, S. Okonogi, R.M. Schiffelers, W.E. Hennink**, Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment, *Biomaterials* 35 (**2014**) 3365–3383.
- [226] **U. Yucel, R.J. Elias, J.N. Coupland**, Localization and reactivity of a hydrophobic solute in lecithin and caseinate stabilized solid lipid nanoparticles and nanoemulsions, *Journal of Colloid and Interface Science* 394 (**2013**) 20–25.
- [227] **T.P. Nordén, B. Siekmann, S. Lundquist, M. Malmsten**, Physicochemical characterisation of a drug-containing phospholipid-stabilised o/w emulsion for intravenous administration, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 13 (**2001**) 393–401.

## A Anhang

### A 1 <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von KuRei300

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des KuRei300, das in dieser Arbeit verwendet wurde: <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 1.37 (s, 9 H, CH<sub>3</sub>), 3.59 (s, 2 H, azepine CH<sub>2</sub>), 6.83 (dd, *J* = 3.6, 1.7 Hz, 1 H, arH), 7.30 – 7.28 (m, 1 H, arH), 7.34 – 7.30 (m, 1 H, arH), 7.40 (dd, *J* = 8.6, 0.7 Hz, 1 H, arH), 7.63 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H, arH), 7.75 (d, *J* = 15.7 Hz, 1 H, (C=O)C=CH), 7.80 (d, *J* = 15.6 Hz, 1 H, (C=O)C=CH), 7.80 (dd, *J* = 3.6, 0.7 Hz, 1H, arH), 7.86 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1 H, arH), 8.11 (dd, *J* = 1.7, 0.7 Hz, 1 H, arH), 8.18 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, arH), 10.35 (s, 1 H, NH), 11.51 (s, 1 H, NH).

### A 2 pH-Werte der Pufferuntersuchungen für Trimyristinemulsionen

In Tabelle A2-1 sind die pH-Werte verschiedener Pufferlösungen und mit diesen gepufferten Trimyristinemulsionen direkt nach der Herstellung und nach mehrtägiger Lagerung aufgeführt. Der Tris-Puffer ist für die Einstellung von pH 7 offenbar nicht die beste Wahl. Vielleicht wäre ein Phosphatpuffer etwas geeigneter.

**Tabelle A2-1:** pH-Werte in verschiedenen Pufferlösungen und entsprechend gepufferten Trimyristinemulsionen direkt nach der Herstellung und nach Lagerung.

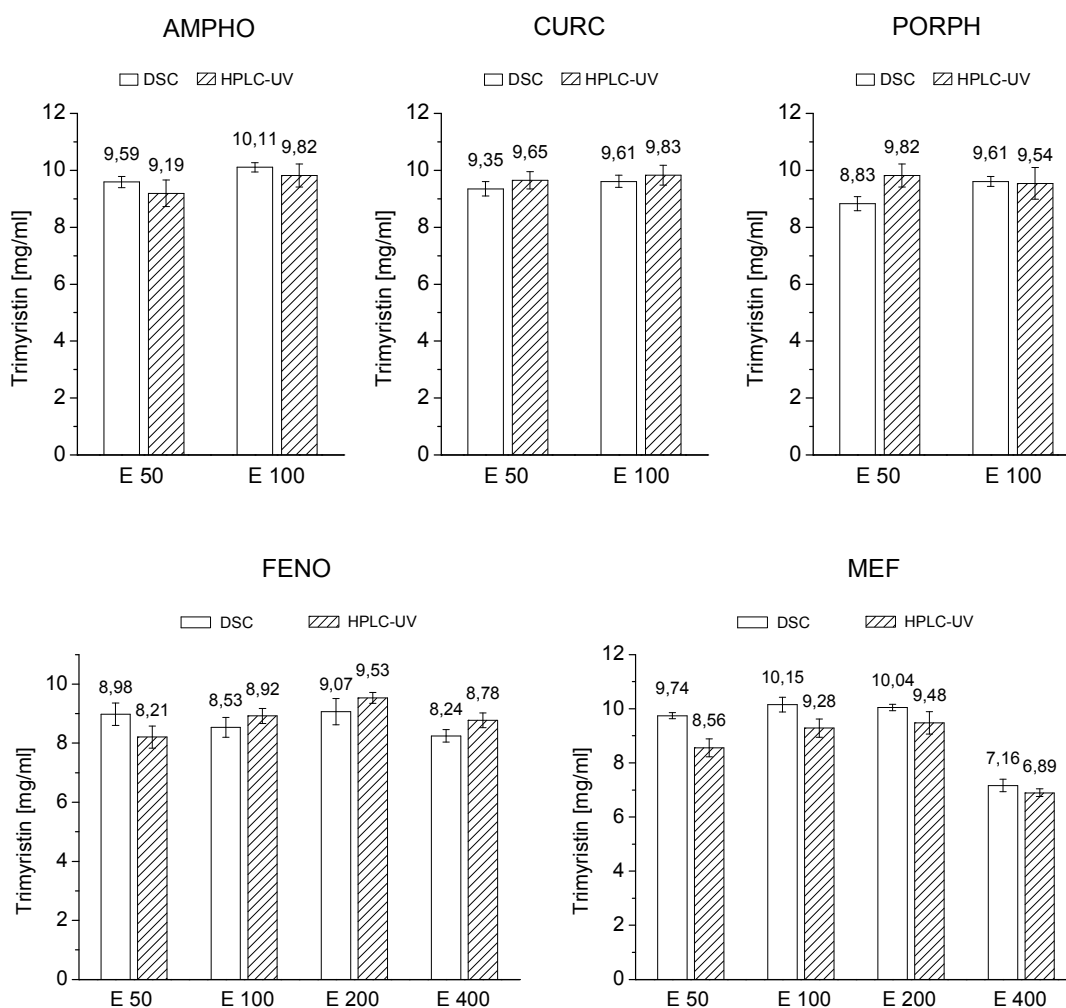
Pufferbestandteile	Puffer pH an Tag		E100 an Tag		E200 an Tag		E400 an Tag	
	1	11	1	11	1	11	1	11
Na-Acetat x 3 H <sub>2</sub> O, Eisessig	4	4		4,2		4,2		4,2
Na-Acetat x 3 H <sub>2</sub> O, Eisessig	5	5,1	-	5,2	-	5,1	-	5,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	6	6	-	6,3	-	6,1	-	6,2
TRIS-Base, HCl	7	6,7	-	6,7	-	6,2	-	6,7
TRIS-Base, HCl	8	8	-	7,9	-	7,8	-	7,9
TRIS-Base, HCl	9	9		8,9		8,8		8,8



## A 3 Quantifizierung von Trimyristin mit DSC

### A 3.1 Vergleich DSC und HPLC-UV

Die Kristallisationsenthalpie [J/g] von Trimyristin wurde als Maß für dessen Konzentration in den Dispersionen genutzt. Auf dieser Grundlage wurden die Dispersionen auf einen in etwa gleichen Lipidgehalt eingestellt. Für einige beladene Emulsionen wurde diese Kristallisationsenthalpie nochmals bestimmt und die erhaltenen Werte für die Trimyristinkonzentration mit den Ergebnissen der HPLC-UV-Analyse verglichen (Abbildung A3-1). Bezüglich der ermittelten Trimyristinkonzentrationen lässt sich kein Unterschiedstrend zwischen den beiden Methoden feststellen. Insbesondere unter Berücksichtigung der Standardabweichungen sind die Unterschiede sehr gering.



**Abbildung A3-1:** Vergleich der ermittelten Trimyristinkonzentration in beladenen Nanoemulsionen in Abhängigkeit von der verwendeten Quantifizierungsmethode. Untersucht wurden Emulsionen, die mit Amphotericin B (AMPHO), Curcumin (CURC), Porphyrin (PORPH), Fenofibrat (FENO) oder Mefenaminsäure (MEF) beladen waren. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; DSC:  $n=4$ , HPLC-UV:  $n=8$ .

## **A 4 Quantifizierung von Trimyristin mit HPLC-ELSD**

Der ELSD ist im Gegensatz zum UV-Detektor zur Detektion von Substanzen ohne Chromophor geeignet. Dazu zählen beispielsweise bestimmte Tenside, Zucker und Lipide. Das Detektionsprinzip besteht darin, dass das Eluat nach dem Verlassen der Säule vernebelt und in einer beheizbaren Röhre (Drift Tube) verdampft wird. Die nach dem Verdampfen der mobilen Phase verbliebenen Analytmoleküle führen zu einer Lichtstreuung, die detektiert wird. Diese Lichtstreuung ist (nicht direkt) proportional zur Menge an enthaltenem Analyten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit fiel bei der Quantifizierung von Trimyristin auf, dass die Peakflächen im Verlauf eines Versuchstages erheblich fluktuierten. Offensichtliche Fehlerquellen wie schwankende Säulentemperaturen, unzureichende Löslichkeit im gewählten Lösungsmittel oder Verdampfen des Lösungsmittels aus Messkolben oder Injektionsgefäßen wurden ausgeschlossen. Alle geräteinternen Tests zu Temperaturregelung, Gasfluss, Temperatur und Sauberkeit der Optik des ELSD erfüllten die Herstellervorgaben. Auf Anraten der Firma Sasol (Ansprechpartner Herr Plum), von der das verwendete Trimyristin bezogen wurde, wurde der ELSD regelmäßig der geräteinternen Reinigungsprozedur unterworfen. Dazu wird die Drift Tube auf 120°C temperiert und ohne Säule für etwa 1,5 Stunden mit Wasser gespült. Um mögliche Adsorptionsphänomene von Trimyristin auf der Säule als Fehlerquelle auszuschließen, wurde der ELSD auf Anraten der Firma Techlab versuchsweise ohne Säule betrieben. Dies führte allerdings zu in keiner Weise reproduzierbaren Peaks.

Neben den angesprochenen Maßnahmen und der Elimination möglicher Fehlerquellen sind Versuchsreihen zur Peakflächenreproduzierbarkeit und relativer Standardabweichung (RSD) durchgeführt worden, um mögliche Muster zu erkennen. Im Folgenden sind einige dieser Versuchsreihen dargestellt. Variiert wurden Parameter wie HPLC-Säule, mobile Phase, Flussrate und Injektionsvolumen. Die HPLC-Anlage entsprach prinzipiell der unter 3.2.8.1 beschriebenen mit der Abweichung, dass ein Verdampfungslichtstreuendetektor (ELSD; Alltech 3300 ELSD, Grace, Worms, Deutschland) angeschlossen war. Je nach Versuchsaufbau war zusätzlich der UV-Detektor davor geschaltet. Alle Ergebnisse eines Experimentes wurden an einem Messtag erhoben.

#### A 4.1 Vergleich von UV-Detektor und ELSD

Um die HPLC-Anlage selbst als Ursache für die Peakflächenfluktuationen auszuschließen, wurden verschiedene Substanzen sowohl mittels UV- als auch ELS-Detektor quantifiziert. Da der UV-Detektor das Eluat nicht zerstört, konnte der ELSD direkt in Reihe dahinter geschaltet werden.

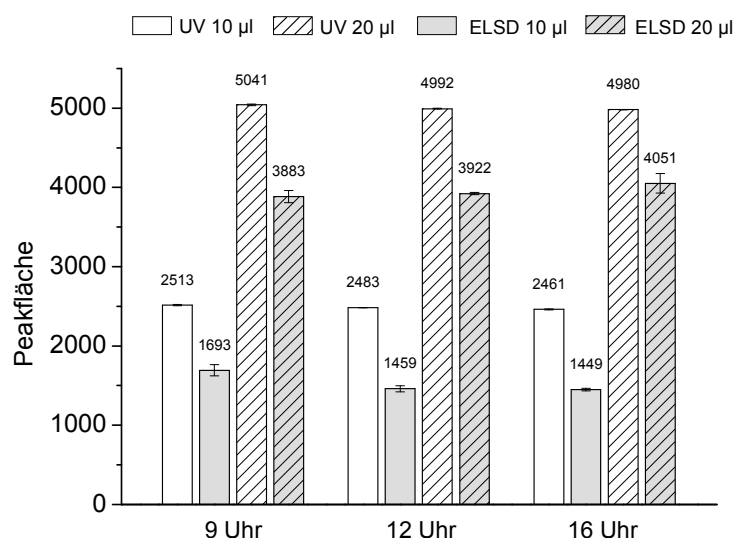
##### A 4.1.1 Betamethason-17-valerat

**Probe:** BTMV: 0,15 mg/ml in mobiler Phase gelöst, dreifache Injektion von je 10 µl oder 20 µl,

**Elutionsbedingungen:** Säule: Grom Hypersil ODS (125x4 mm, 5 µm, mit Vorsäule) bei 25°C; mobile Phase: ACN/Wasser (60/40), Fluss: 1,2 ml/min

**Detektoren:** UV-Detektor bei 240 nm; ELSD bei 42°C, Stickstofffluss von 1,6 l/min und Verstärkung 2

**Ergebnisse** (Abbildung A4-1): Die maximalen RSD reichten sich wie folgt: UV 20 µl  $\leq 0,22$  %; UV 10 µl  $\leq 0,35$  %; ELSD 20 µl  $\leq 3,02$  %; ELSD 10 µl  $\leq 4,24$  %. Die maximalen Abweichungen vom Mittelwert der Peakfläche zum ersten Messzeitpunkt betrugen: UV 20 µl 1,2 %; UV 10 µl 2,1 %; ELSD 20 µl 4,3 %; ELSD 10 µl 14,4 %. Sowohl die RSD als auch die Peakflächenunterschiede zu verschiedenen Messzeitpunkten waren beim UV-Detektor wesentlich kleiner als beim ELSD. Bei beiden Detektoren führten erwartungsgemäß 20 µl Injektionsvolumen zu besseren Ergebnissen als 10 µl.



**Abbildung A4-1:** Quantifizierung von Betamethason-17-valerat mittels HPLC. Untersucht wurden die Peakflächen und RSD in Abhängigkeit vom Injektionsvolumen und dem Detektor. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n=3$ .

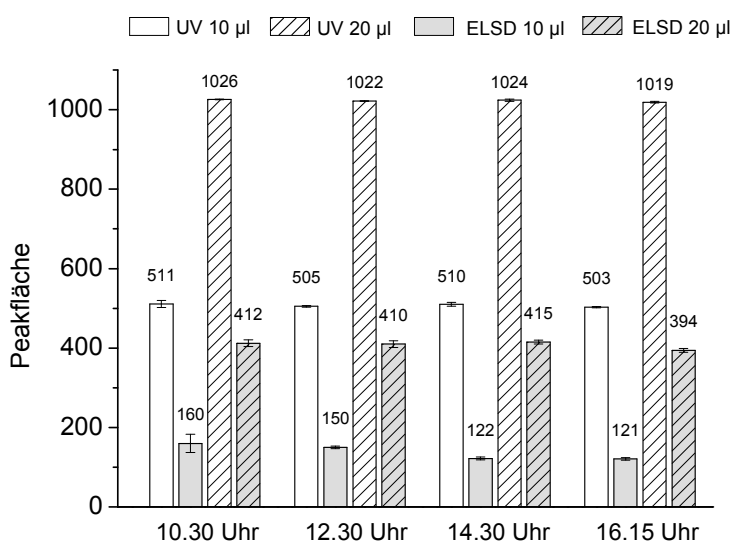
#### A 4.1.2 Mefenaminsäure

**Probe:** MEF: unbekannte Konzentration in mobiler Phase gelöst, doppelte Injektion von je 10 µl oder 20 µl

**Elutionsbedingungen:** Säule: Grom Hypersil ODS (125x4 mm, 5 µm, mit Vorsäule) bei 25°C; mobile Phase ACN/Wasser/Essigsäure (65/35/0,1), Fluss: 1,5 ml/min

**Detektoren:** UV-Detektor bei 276 nm; ELSD bei 42°C, Stickstofffluss von 1,6 l/min und Verstärkung 2

**Ergebnisse** (Abbildung A4-2): Die maximalen RSD reichten sich wie folgt: UV 20 µl  $\leq$  0,28 %; UV 10 µl  $\leq$  1,67 %; ELSD 20 µl  $\leq$  2,87 %; ELSD 10 µl  $\leq$  14,21 %. Die maximalen Abweichungen vom Mittelwert der Peakfläche zum ersten Messzeitpunkt betrugen: UV 20 µl 0,7 %; UV 10 µl 1,6 %; ELSD 20 µl 4,4 %; ELSD 10 µl 24,4 %. Sowohl die RSD als auch die Peakflächenunterschiede zu verschiedenen Messzeitpunkten waren beim UV-Detektor wesentlich kleiner als beim ELSD. Bei beiden Detektoren führten erwartungsgemäß 20 µl Injektionsvolumen zu besseren Ergebnissen als 10 µl.



**Abbildung A4-2:** Quantifizierung von Mefenaminsäure mittels HPLC. Untersucht wurden die Peakflächen und RSD in Abhängigkeit vom Injektionsvolumen und dem Detektor. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n=2.

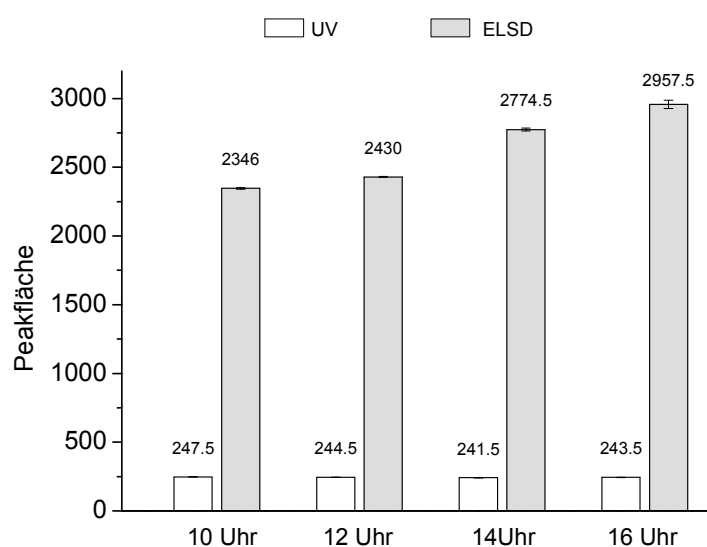
#### A 4.1.3 Cholesterylmyristat

**Probe:** Cholesterylmyristat (Dispersion mit Poloxamer): etwa 0,31 mg/ml in ACN/THF (20/80) gelöst, doppelte Injektion von 30 µl

**Elutionsbedingungen:** Säule: LiChrospher® 100 RP-18 (250x4 mm, 5 µm, mit Vorsäule) bei 25°C; mobile Phase ACN/THF (50/50), Fluss: 1,5 ml/min

**Detektoren:** UV-Detektor bei 213 nm; ELSD bei 41°C, Stickstofffluss von 1,6 l/min und Verstärkung 1

**Ergebnisse** (Abbildung A4-3): Die maximalen RSD waren beim UV-Detektor  $\leq 0,3$  und beim ELSD  $\leq 1,0$ . Die maximalen Abweichungen vom Mittelwert der Peakfläche zum ersten Messzeitpunkt betrugen beim UV-Detektor 2,4 % und beim ELSD 26 %. Der UV-Detektor war demnach dem ELSD bei beiden Kennzahlen überlegen.



**Abbildung A4-3:** Quantifizierung von Cholesterylmyristat mittels HPLC. Untersucht wurden die Peakflächen und RSD in Abhängigkeit vom Detektor. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n=2$ .

#### A 4.1.4 Trimyristin

**Probe:** Trimyristin (Dispersion mit Tyloxapol): etwa 0,2 mg/ml in ACN/THF (20/80) gelöst, doppelte Injektion von 20 µl

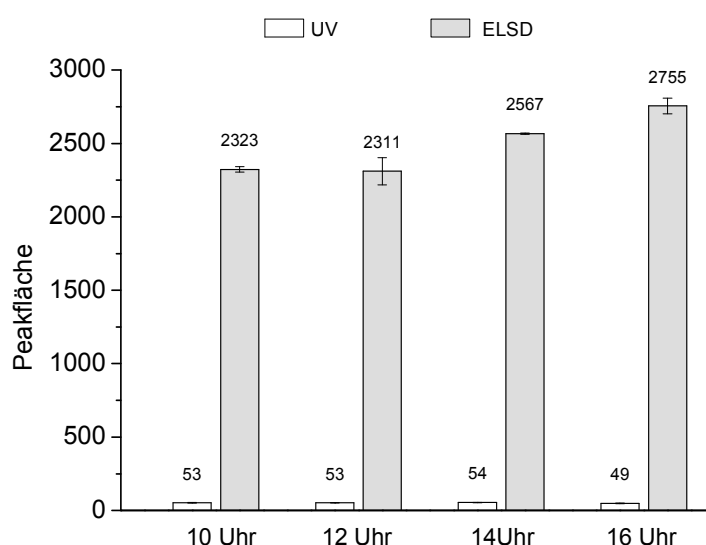
**Elutionsbedingungen:** Säule: LiChrospher® 100 RP-18 (250x4 mm, 5 µm, mit Vorsäule) bei 25°C; mobile Phase ACN/THF (50/50), Fluss: 1,5 ml/min

**Detektoren:** UV-Detektor bei 213 nm; ELSD bei 41°C, Stickstofffluss von 1,6 l/min und Verstärkung 1

**Ergebnisse** (Abbildung A4-4): Die maximalen RSD waren beim UV-Detektor  $\leq 4,4$  % und beim ELSD  $\leq 4,0$  %. Die maximalen Abweichungen vom Mittelwert der Peakfläche zum ersten Messzeitpunkt betrugen beim UV-Detektor 8,5 % und beim ELSD 18,6 %. Der UV-Detektor führte in diesem Fall zu relativ hohen RSD und auch Fluktuationen der Peakflächen. Das lag vermutlich an den absolut gesehen sehr kleinen Signalen, so dass bei der Integration der Peakfläche die Fehler vergleichsweise hoch waren.

#### A 4.1.5 Zusammenfassung

Insgesamt war der UV-Detektor dem ELSD bezüglich RSD und Peakflächenfluktuation deutlich überlegen. Insbesondere die Peakflächenfluktuation erreichte nie das Ausmaß des ELSD, so dass es sich um ein detektorspezifisches Phänomen handeln muss und nicht die HPLC-Anlage selbst die Ursache sein kann.



**Abbildung A4-4:** Quantifizierung von Trimyristin mittels HPLC. Untersucht wurden die Peakflächen und RSD in Abhängigkeit vom Detektor. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n=5$

#### A 4.2 Alternative mobile Phase

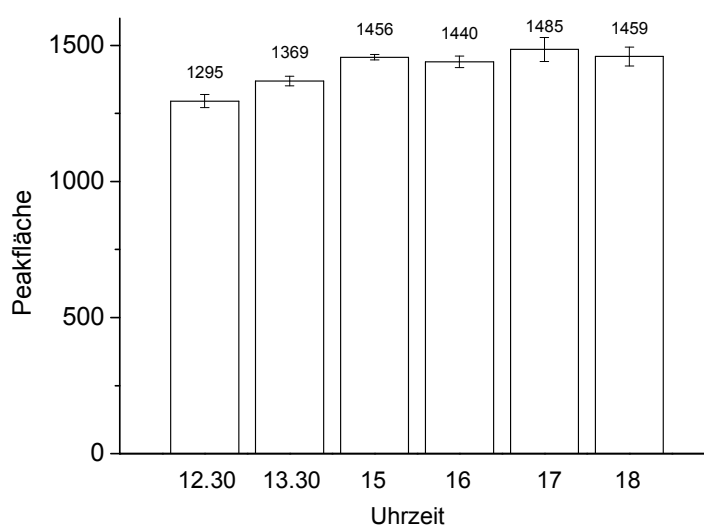
Obwohl das verwendete THF auf Peroxide getestet worden war, sollten diese als Ursache für die Peakflächenfluktuation ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde eine alternative mobile Phase getestet.

**Probe:** Trimyristin: 0,4 mg/ml in Chloroform/ACN (80/20) gelöst, fünffache Injektion (aus einem Probengefäß) von 20 µl

**Elutionsbedingungen:** Säule: LiChroCART® mit Purospher® STAR RP-18e (125x4 mm, 5 µm, mit Vorsäule) bei 25°C; mobile Phase Chloroform/ACN (50/50), Fluss: 1,5 ml/min

**Detektoren:** ELSD bei 89°C, Stickstofffluss von 2,5 l/min und Verstärkung 1

**Ergebnisse** (Abbildung A4-5): Die maximale RSD betrug 2,94 % und die maximale Abweichung vom Mittelwert der Peakfläche zum ersten Messzeitpunkt 14,7 %. Die mobile Phase mit Chloroform/ACN (50/50) führte demnach zu keiner Verbesserung im Vergleich zu den bisher verwendeten THF/ACN-Mischungen.



**Abbildung A4-5:** Quantifizierung von Trimyristin mittels HPLC-ELSD. Untersucht wurden die Peakflächen und RSD mit einer alternativen mobilen Phase, die Chloroform enthält. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n=5$

### A 4.3 Externe Beheizung des Verneblers

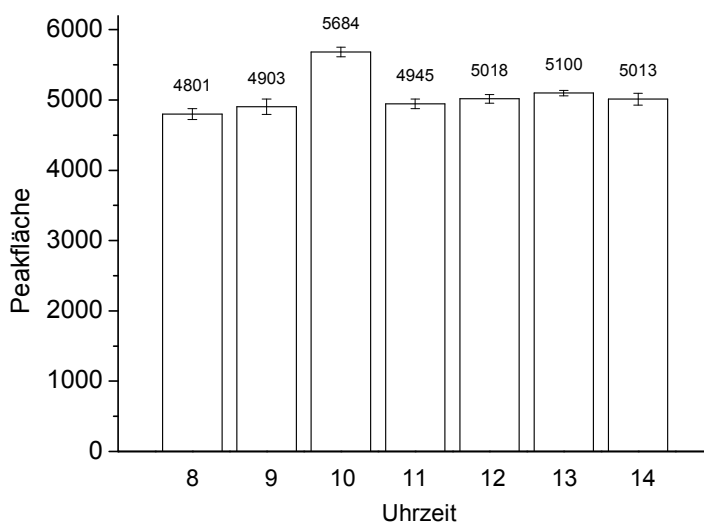
Es gibt ELSD-Modelle, bei denen Drift Tube und Vernebler (Nebulizer) separat beheizbar sind (z.B. Firma Waters). Um ein Temperaturgefälle zwischen dem in die Drift Tube eintretenden Eluat und der Drift Tube selbst als Ursache für die Peakflächenfluktuation auszuschließen, wurde ein Heizelement für den Vernebler an den ELSD angebracht. Sie bestand aus einer Edelstahlplatte, die mit einem steuerbaren Thermoelement versehen war und wurde in Kooperation der Feinmechanikerwerkstatt (Holger Kubiak) und der Elektrowerkstatt (Sven Pape) des Instituts angefertigt.

**Probe:** Trimyristin: 0,32 mg/ in ACN/THF (20/80) gelöst, fünffache Injektion (aus einem Probengefäß) von 20 µl

**Elutionsbedingungen:** Säule: LiChroCART® mit Purospher® STAR RP-18e (125x4 mm, 5 µm, mit Vorsäule) bei 25°C; mobile Phase THF/ACN (45/55), Fluss: 1,4 ml/min

**Detektoren:** ELSD bei 57°C, Stickstofffluss von 1,7 l/min und Verstärkung 1. Der Vernebler wurde mit dem externen Heizelement auf 37°C temperiert.

**Ergebnisse** (Abbildung A4-6): Die maximale RSD betrug 2,23 % und die maximale Abweichung vom Mittelwert der Peakfläche zum ersten Messzeitpunkt 18,4 %. Mit Ausnahme des Messblocks um 10 Uhr war die Schwankungsbreite der Messwerte verhältnismäßig gering. Das Ergebnis kann dennoch kaum als zufriedenstellend bezeichnet werden, weil bei einer Kalibrierung oder Messung nicht vorhersehbar wäre, wann ein möglicher „Ausreißer“ auftritt.



**Abbildung A4-6:** Quantifizierung von Trimyristin mittels HPLC-ELSD. Untersucht wurden die Peakflächen und RSD unter externer Beheizung des Verneblers. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n=5$



#### A 4.4 Optimierung von Analytmenge und Injektionsvolumen

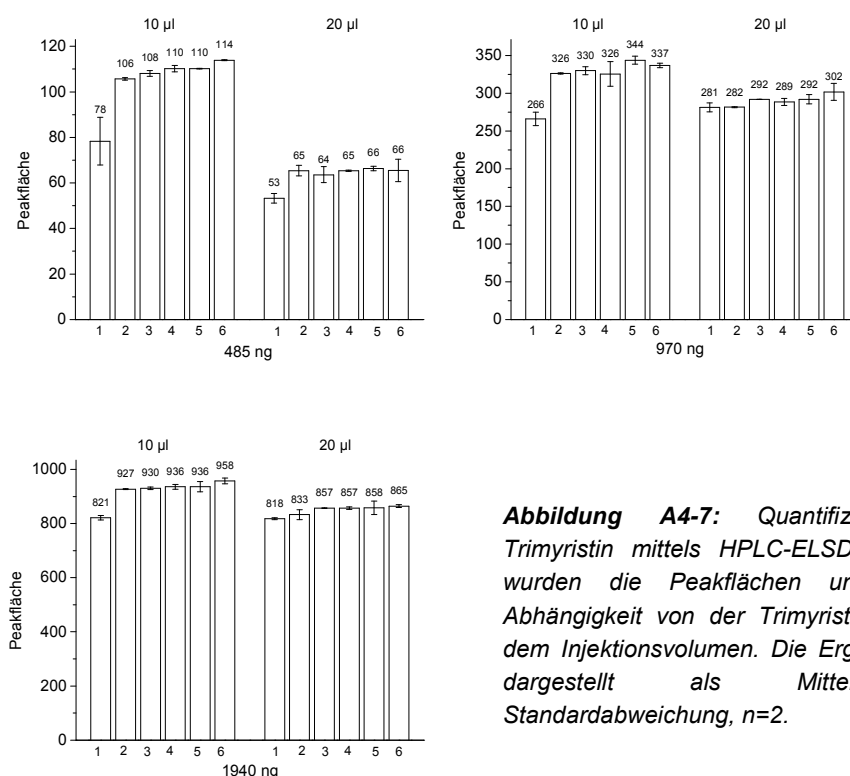
Es sollte untersucht werden, inwiefern die Stoffmenge des Analyten pro Injektion eine Rolle für die Peakflächenfluktuation spielt.

**Probe:** Trimyristin in ACN/THF (20/80) gelöst, doppelte Injektion (aus einem Probengefäß) in Zeitabständen von etwa 50 Minuten, unterschiedliche Kombinationen von Trimyristinmenge und Injektionsvolumen

**Elutionsbedingungen:** Säule LiChrospher® 100 RP-18 (250x4 mm, 5 µm, mit Vorsäule) bei 25°C; mobile Phase THF/ACN (50/50), Fluss: 1,5 ml/min

**Detektoren:** ELSD bei 41°C, Stickstofffluss von 1,6 l/min und Verstärkung 1

**Ergebnisse** (Abbildung A4-7): Interessant ist, dass bei gleicher Trimyristinmenge das größere Injektionsvolumen die kleinere Peakfläche erzeugte. Dieser Effekt war umso ausgeprägter, je kleiner die Trimyristinmenge war. Die maximalen RSD reihen sich wie folgt: 1940 ng/10 µl ≤ 2 %; 1940 ng/20 µl ≤ 2 %; 970 ng/20 µl ≤ 3,7 %; 970 ng/10 µl ≤ 5,9 %; 485 ng/20 µl ≤ 7,6 %; 485 ng/10 µl ≤ 13,5 %. Die maximalen Abweichungen vom Mittelwert der Peakfläche zum ersten Messzeitpunkt betrugen: 1940 ng/20 µl 6 %; 970 ng/20 µl 7 %; 1940 ng/10 µl 17 %; 485 ng/20 µl 24 %; 970 ng/10 µl 29 %; 485 ng/10 µl 46 %. Insgesamt schnitten die Injektionen von 20 µl besser ab als die von 10 µl. Lediglich bei den RSD gab es die Ausnahme von 1940 ng/10 µl. Die Peakflächenfluktuationen waren bei gegebener Trimyristinmenge jedoch ausnahmslos bei dem größeren Injektionsvolumen geringer als bei dem kleinen. Demnach sollten wenn möglich 20 µl Probe injiziert werden.



**Abbildung A4-7:** Quantifizierung von Trimyristin mittels HPLC-ELSD. Untersucht wurden die Peakflächen und RSD in Abhängigkeit von der Trimyristinmenge und dem Injektionsvolumen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n=2.

#### **A 4.5 Vergleich von ELSD und CAD**

Um Betriebsstörungen der HPLC und des ELSD endgültig auszuschließen, wurden Messungen im Labor der Firma LPU (Labor für Pharma- und Umweltanalytik, München) durchgeführt. Dort bestand außerdem die Möglichkeit, Vergleichsmessungen mit einem Charged Aerosol Detektor (CAD) vorzunehmen.

##### **A 4.5.1 Experimentelle Details**

ELSD und CAD wurden an separaten modularen HPLC-Systemen betrieben (Shimadzu Prominence, Shimadzu Europa, Duisburg, Deutschland). Soweit nicht anderes angegeben, waren alle einzelnen Modulteile von der Firma Shimadzu.

##### **ELSD**

Die Anlage mit ELSD (ELSD-LT II) war mit einem Säulenofen (CTO-10AS VP), einem Autosampler (SIL-20AC, Probenschleife 500µl), einer Pumpe (LC-20AD), einem Onlinevakuumengaser (DGU-20A3) und einer Steuereinheit (CBM-20A) bestückt. Die Regelung der Stickstoffzufuhr für den ELSD erfolgte mit dem Hochpräzisionsdruckregler Manostat (Fa. Aircom). Erzeugt wurde der Stickstoff mit einem Kompressor (Parker NitroFlow Lab, Parker, Hannifin Town, Großbritannien) mit einer Reinheit von 99,9 %. Betrieben wurde der ELSD bei 80°C, 4,07 bar und einer Verstärkung von 11. Die mobile Phase bestand aus THF/ACN (50/50) und wurde mit 1,5 ml/min über die Säule (Purospher STAR RP-18e, 125x 4l.D.; 5µm, mit Vorsäule) gepumpt, woraus ein Druck von 76 bar resultierte. Die Datenaufzeichnung und -verarbeitung erfolgte mit der Software LCsolutions Version 1.22 (ebenfalls Shimadzu).

##### **CAD**

Die Anlage mit CAD (Corona Ultra, Esa, ) war mit einem Säulenofen (CTO-10AS VP), einem Autosampler (SIL-20AC, einer Probenschleife 500µl), zwei Pumpen (LC-20AT) und einem Onlinevakuumengaser (DGU-20A5) bestückt. Der für den CAD benötigte Stickstoff wurde mit einem Kompressor (Atlas Copco SF4) und einem Stickstoffgenerator (Maxigas N<sub>2</sub>MID350) erzeugt. Die Datenaufzeichnung und -verarbeitung erfolgte mit der Software LCsolutions Version 1.24 (ebenfalls Shimadzu).

##### **Probe**

Die Probe bestand aus Trimyristin (etwa 0,2 mg/ml), das in der mobilen Phase gelöst war. Es wurden 10 µl in einstündigen Abständen jeweils fünffach injiziert.

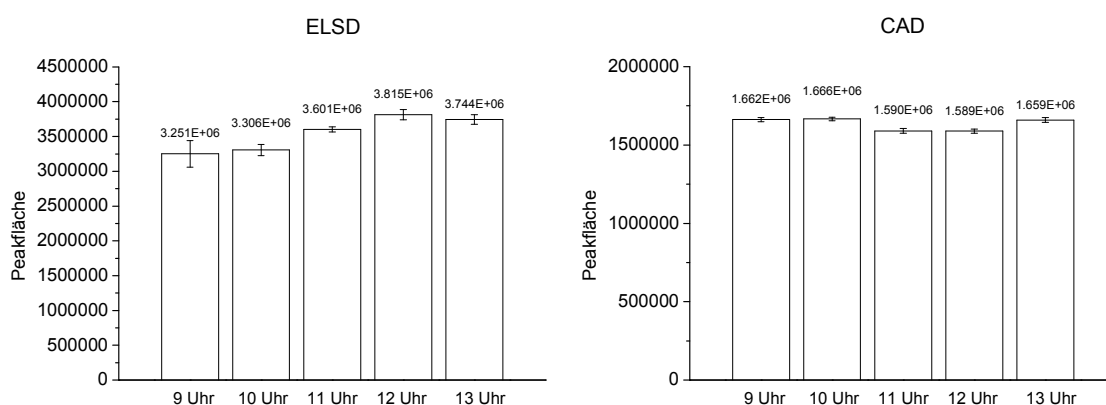
##### **A 4.5.2 Ergebnisse**

Die Peakflächenfluktuation bei ELS-Detektion traten auch an dieser Anlage auf, wobei die maximale Schwankung 17 % betrug (Abbildung A4-8). Auch bei der CAD-Detektion traten leichte Fluktuationen auf, die allerdings mit maximal 4 % wesentlich geringer waren (Abbildung A4-8). Die RSD waren mit maximal 0,92 % ebenfalls geringer als beim ELSD mit

maximal 5,87 %. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Reproduzierbarkeitsproblematik nicht in der bisher verwendeten HPLC-ELSD-Anlage begründet war.

#### A 4.6 Schlussfolgerungen für die Lipidquantifizierung mit HPLC-ELSD

Wie dargestellt, wurde ausführlich versucht, die Ursache für die Peakflächenfluktuation bei der Quantifizierung von Trimyristin zu finden. Leider ist dies nicht gelungen. Minimiert werden konnten die Fluktuationen durch die Injektion von 20 µl Probe mit einem Analytgehalt von mindestens 970 ng Trimyristin, was einer Konzentration von etwa 0,05 mg/ml entspricht. Insgesamt waren die Resultate mit dem UV-Detektor jedoch besser reproduzierbar.



**Abbildung A4-8:** Vergleich der Peakflächenfluktuationen bei der Trimyristinquantifizierung mittels HPLC in Abhängigkeit vom verwendeten Detektor. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n=5$ .